

Ročník 2005



SBÍRKA ZÁKONŮ

ČESKÁ REPUBLIKA

Částka 157

Rozeslána dne 15. listopadu 2005

Cena Kč 86,50

O B S A H:

449. Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 443/2004 Sb., kterou se stanoví základní metody pro zkoušení toxicity chemických látek a chemických přípravků

449

VYHLÁŠKA

ze dne 7. listopadu 2005,

kteřou se mění vyhláška č. 443/2004 Sb., kterou se stanoví základní metody pro zkoušení toxicity chemických látek a chemických přípravků

Ministerstvo zdravotnictví stanoví podle § 8 odst. 5 písm. b) zákona č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů:

Čl. I

Vyhláška č. 443/2004 Sb., kterou se stanoví základní metody pro zkoušení toxicity chemických látek a chemických přípravků, se mění takto:

1. V § 1 odst. 1 se slova „stanoví v souladu s prá-
vem Evropských společenství^{1), 2), 3), 4), 5), 6), 7)}“ nahra-
zují slovy „zapracovává příslušné předpisy Evrop-
ských společenství^{1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 7^a)} a stanoví“.

Poznámka pod čarou č. 7a) zní:

^{7a)} Směrnice Komise 2004/73/ES, kterou se po dvacáté deváté přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/ /EHS o sblížení právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek (L 152 2004).“.

2. Seznam základních metod pro zkoušení toxicity chemických látek nebo chemických přípravků se zrušuje.

3. Vkládá se nová příloha č. 1, která zní:

„Příloha č. 1 k vyhlášce č. 443/2004 Sb.

Seznam základních metod pro zkoušení toxicity chemických látek nebo přípravků

B.1 bis Akutní toxicita orální - metoda fixní dávky

- B.1 tris Akutní toxicita orální - metoda stanovení třídy akutní toxicity
- B.2 Akutní toxicita inhalační
- B.3 Akutní toxicita dermální
- B.4 Akutní toxicita: dráždivé a leptavé účinky na kůži
- B.5 Akutní toxicita: dráždivé a leptavé účinky na oči
- B.6 Senzibilizace kůže
- B.7 Subakutní toxicita orální (per os) (28 denní opakovaná aplikace)
- B.8 Subakutní toxicita inhalační (28 denní opakovaná aplikace)
- B.9 Subakutní toxicita dermální (28 denní opakovaná aplikace)
- B.10 Mutagenita - test chromozómových aberací u savčích buněk *in vitro*
- B.11 Mutagenita - test chromozómových aberací v kostní dřeni savců *in vivo*
- B.12 Mutagenita - *in vivo* mikronukleus test v savčích erytrocytech
- B.13/14 Mutagenita - test reverzních mutací u bakterií
- B.15 Genové mutace - *Saccharomyces cerevisiae*
- B.16 Mitotické rekombinace - *Saccharomyces cerevisiae*
- B.17 Mutagenita - test genových mutací v savčích buňkách *in vitro*
- B.18 Poškození DNA reparace - neplánovaná syntéza DNA – savčí buňka *in vitro*
- B.19 SCE - výměna sesterských chromatid *in vitro*
- B.20 Recesivní letální mutace vázané na pohlaví u *Drosophila melanogaster*
- B.21 Test transformace savčích buněk *in vitro*
- B.22 Dominantní letální test u hlodavců
- B.23 Analýza chromozómových aberací u savčích spermatogonií
- B.24 Spot test u myši
- B.25 Přenosné translokace u myši
- B.26 Test subchronické orální toxicity (90 denní studie orální toxicity s opakovanou aplikací hlodavcům)
- B.27 Test subchronické orální toxicity (90 denní studie orální toxicity s opakovanou aplikací nehlodavcům)
- B.28 Subchronická toxicita dermální (90 denní opakovaná aplikace, studie na hlodavcích)
- B.29 Subchronická toxicita inhalační (90 denní opakovaná aplikace, studie na hlodavcích)
- B.30 Testování chronické toxicity
- B.31 Studie prenatální vývojové toxicity
- B.32 Test karcinogenity
- B.33 Kombinovaný test chronické toxicity/karcinogenity
- B.34 Reprodukční toxicita - jednogeneční test
- B.35 Dvougeneční studie reprodukční toxicity
- B.36 Toxikokinetika
- B.37 Pozdní neurotoxicita organických sloučenin fosforu
- B.38 Pozdní neurotoxicita organických sloučenin fosforu - 28 denní opakovaná expozice
- B.39 Test neplánované syntézy DNA v savčích jaterních buňkách *in vivo*
- B.40 Leptavé účinky na kůži
- B.41 Fototoxicita - test fototoxicity 3T3 NRU - *in vitro*
- B.42 Senzibilizace kůže: zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin

B.43 Zkouška neurotoxicity na hlodavcích “.

Dosavadní příloha č. 1 se označuje jako příloha č. 2.

4. V příloze č. 2 části Všeobecný úvod se za bod 1.20 vkládají body 1.21 až 1.26, které znějí:

„1.21 GHS

Globálně harmonizovaný systém klasifikace chemických látek a směsí. Společný projekt Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (lidské zdraví a životní prostředí), Odborného výboru OSN pro přepravu nebezpečného zboží (fyzikálně-chemické vlastnosti) a Mezinárodní organizace práce (informace o nebezpečnosti) koordinovaný Meziorganizačním programem pro řádné nakládání s chemikáliemi (IOMC).

1.22 Blížící se uhynutí

když je očekáván stav agónie nebo uhynutí před další plánovanou dobou pozorování. Příznaky svědčící o tomto stavu u hlodavců mohou zahrnovat křeče, polohu na boku, polohu vleže a třes^{7a)}.

1.23 Limitní dávka

označuje nejvyšší přípustnou dávku (2 000 nebo 5 000 mg/kg).

1.24 Stav agónie

označuje stav před úhynem nebo neschopnost přežít, ani když je pokusné zvíře léčeno^{7a)}.

1.25 Předvídatelný úhyn

přítomnost klinických příznaků svědčících o blížící se smrti, přičemž čas, kdy k úhynu dojde lze předvídat a bude kratší než je doba předpokládaného ukončení pokusu^{7a)}.

1.26 Opožděný úhyn

znamená, že pokusné zvíře během 48 h neuhyne ani nejeví známky umírání, ale uhyne později během čtrnáctidenní doby pozorování.“.

5. V příloze č. 2 metoda B.1 bis AKUTNÍ TOXICITA ORÁLNÍ (PER OS) METODA FIXNÍ DÁVKY zní:

„B.1 bis AKUTNÍ TOXICITA ORÁLNÍ – METODA FIXNÍ DÁVKY

1 METODA je v souladu s právem Evropských společenství^{7a)}.

1.1 ÚVOD

Podstatou metody je použití pouze středně toxických dávek v hlavní studii a dávky, u nichž se očekává, že budou letální, by neměly být podávány. Také není nutné podávat dávky, o nichž je známo, že v důsledku leptavých nebo výrazně dráždivých účinků vyvolávají značnou bolest a utrpení. Umírající pokusná zvířata nebo pokusná zvířata, která zjevně projevují příznaky bolesti nebo značného a přetrvávajícího utrpení, se humánně utratí a při interpretaci výsledků jsou hodnocena jako pokusná zvířata uhynulá při zkoušce^{7a)}.

Metoda poskytuje informace o nebezpečných vlastnostech a umožňuje zařazení a klasifikaci látky podle globálně harmonizovaného systému (GHS) klasifikace chemických látek, které způsobují akutní toxicitu^{7a)}.

Zkušební laboratoř by před provedením studie měla vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené látce. Součástí těchto informací je totožnost a chemická struktura látky, její fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky jiných zkoušek toxicity dané látky *in vitro* nebo *in vivo*, toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách a očekávané použití látky. Tyto informace jsou nezbytné k tomu, aby byli všichni zainteresovaní přesvědčeni, že zkouška má význam pro ochranu lidského zdraví a pomůže při výběru vhodné výchozí dávky.

1.2 DEFINICE

Akutní orální toxicita: vztahuje se na nepříznivé účinky, které se projeví po orálním podání jedné dávky nebo více dávek látky během 24 h.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Skupině pokusných zvířat stejného pohlaví se postupně podá fixní dávka 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg (výjimečně lze uvažovat o další fixní dávce 5 000 mg/kg, viz část 1.6.2). Výchozí úroveň dávky se zvolí na základě orientační studie jako dávka, u níž se očekává, že vyvolá některé příznaky toxicity, aniž způsobí závažné toxické účinky nebo úhyn^{7a)}. Dalším skupinám pokusných zvířat může být podána vyšší nebo nižší dávka podle přítomnosti nebo nepřítomnosti příznaků toxicity nebo uhynutí. Podle tohoto postupu se pokračuje, dokud dávka nevyvolá zřejmou toxicitu nebo není pozorováno více než jedno uhynutí, anebo pokud nejsou při nejvyšší dávce zjištěny žádné účinky nebo pokud dochází k úhynům při nejnižší dávce.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Výběr druhu pokusných zvířat

Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan, avšak lze použít i jiné druhy hlodavců. Obvykle se používají samice^{7a)}. Je to proto, že přehled literatury o konvenčních zkouškách LD₅₀ ukazuje, že mezi pohlavími je obvykle malý rozdíl, pokud jde o citlivost, ale v případech, v nichž jsou rozdíly pozorovány, jsou samice obecně nepatrně citlivější^{7a)}. Pokud však poznatky o toxikologických nebo toxikokinetických vlastnostech strukturně příbuzných chemických látek naznačují, že citlivější jsou pravděpodobně samci, použije se toto pohlaví. Jestliže se zkouška provádí na samcích, je nutné podat náležité odůvodnění.

Použijí se mladá zdravá dospělá pokusná zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Každé pokusné zvíře musí být na začátku podávání látky 8 až 12 týdnů staré a jeho hmotnost by se měla pohybovat v intervalu $\pm 20\%$ střední hmotnosti pokusných zvířat, kterým byla podána předchozí dávka.

1.4.2 Podmínky chovu a krmení

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být $(22 \pm 3)^\circ\text{C}$. Ačkoliv by relativní vlhkost měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50 – 60 %. Osvětlení by mělo být umělé, mělo by se střídát 12 h světla a 12 h tmy, není-li v chovné místnosti denní světlo. Ke krmení lze použít obvyklé krmivo určené pro pokusná zvířata od registrovaného výrobce s neomezenou dodávkou pitné vody. Pokusná zvířata mohou být chována v klecích ve skupinách podle dávky v souladu s příslušným právním předpisem¹⁰⁾, pokud není stanoveno projektem pokusů jinak, ale počet pokusných zvířat v kleci nesmí bránit nerušenému pozorování každého pokusného zvířete.

1.4.3 Příprava pokusných zvířat

Pokusná zvířata jsou vybrána s ohledem na druh, pohlaví a stáří v souladu s ustanovením § 15 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾ a označena tak, aby byla možná identifikace jednotlivých pokusných zvířat. Dobu navykání stanoví § 10 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾.

1.4.4 Příprava dávek

Zkoušená látka by obecně měla být při všech úrovních zkoušených dávek podávána v konstantním objemu pomocí úpravy koncentrace dávkovaného přípravku. V případech, kdy má být zkoušen kapalný konečný produkt nebo směs, může však mít použití nezředěné zkoušené látky, tj. s konstantní koncentrací, větší závažnost pro hodnocení

následného rizika této látky. Ani v jednom případě nesmí být překročen maximální objem dávky. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. U hlodavců by objem obvykle neměl přesáhnout 1 ml/100 g tělesné hmotnosti; avšak u vodných roztoků připadá v úvahu dávka 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. S ohledem na složení dávkovaného přípravku se ve všech případech, kde je to možné, doporučuje použití vodného roztoku/suspenze/emulze, potom v pořadí podle preference použití roztoku/suspenze/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec případně roztoku v jiných vehikulech. U vehikul jiných než voda musí být známy jejich toxikologické charakteristiky. Dávky musí být připraveny krátce před podáním, pokud není stálost přípravku během doby, kdy bude používán, známa a neukáže se jako přijatelná.

1.5 POSTUP

1.5.1 Podávání dávek

Zkoušená látka se podává sondou v jedné dávce pomocí žaludeční sondy nebo vhodné intubační rourky. Pokud výjimečně není možné podat dávku najednou, lze dávku podat po menších množstvích během nejvýše 24 h.

Před podáním zkoušené látky nemají pokusná zvířata dostávat krmivo (např. potkanům by se nemělo podávat přes noc, myším 3 – 4 h), voda se však ponechává. Po uplynutí doby hladovění se pokusná zvířata zváží a podá se jim zkoušená látka. Po podání látky se zamezí přístupu ke krmivu na další 3 – 4 h u potkanů nebo 1 – 2 h u myši. Podává-li se látka po částech v průběhu určité doby, může být podle délky období nezbytné poskytnout pokusným zvířatům krmivo a vodu.

1.5.2 Orientační studie

Cílem orientační studie je umožnit výběr vhodné výchozí dávky pro hlavní studii. Zkoušená látka se podává jednotlivým zvířatům postupně podle vývojového diagramu v tabulce 1. Orientační studie je ukončena, jakmile lze stanovit výchozí dávku pro hlavní studii (nebo pokud je při nejnižší fixní dávce pozorován úhyn).

Výchozí dávka orientační studie se zvolí z fixních úrovní dávek 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg jako dávka, u níž se očekává, že vyvolá zřejmou toxicitu, přičemž toto očekávání je pokud možno založeno na důkazech z údajů získaných *in vivo* a *in vitro* ze stejné chemické látky a ze strukturně příbuzných látek. Pokud takové informace neexistují, výchozí dávka činí 300 mg/kg.

Před podáním dávky každému dalšímu pokusnému zvířeti se ponechá doba minimálně 24 h. Všechna pokusná zvířata se pozorují minimálně 14 dnů.

Ve výjimečných případech a pouze je-li to odůvodněno specifickými regulačními potřebami, lze zvážit použití další nejvyšší úrovně dávky 5 000 mg/kg (viz tabulka 3). S ohledem na dobré zacházení s pokusnými zvířaty se pokusy na pokusných zvířatech v rámci kategorie 5 GHS (2 000 – 5 000 mg/kg) nedoporučují a měly by se zvažovat pouze tehdy, pokud existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takového pokusu mají přímý význam pro ochranu lidského zdraví, zdraví pokusných zvířat nebo životního prostředí.

V případech, kdy pokusné zvíře, u něhož je látka zkoušena v nejnižší fixní úrovni dávky (5 mg/kg), v orientační studii uhynie, obvykle se studie ukončí a látka přiřadí do kategorie 1 GHS (jak je uvedeno v tabulce 1). Pokud je však vyžadováno další potvrzení klasifikace, může být proveden tento volitelný doplňkový postup: druhému pokusnému zvířeti se podá dávka 5 mg/kg. Pokud toto druhé pokusné zvíře uhynie, bude kategorie 1 GHS potvrzena a studie okamžitě ukončena. Pokud druhé pokusné zvíře přežije, dávka 5 mg/kg se podá maximálně třem dalším pokusným zvířatům. Jelikož riziko úhynu bude vysoké, měla by být látka pokusným zvířatům podávána postupně, aby bylo zajištěno dobré zacházení s pokusnými zvířaty. Časový interval mezi dávkami podanými jednotlivým pokusným zvířatům by měl být dostatečný na to, aby bylo možné stanovit, zda pokusné zvíře, jemuž byla látka podána dříve, pravděpodobně přežije. Pokud dojde k úhynu druhého pokusného zvířete, posloupnost podávání se okamžitě ukončí a látka nebude podána žádnému dalšímu pokusnému zvířeti. Vzhledem k tomu, že výskyt druhého úhynu (bez ohledu na počet pokusných zvířat, na nichž byla látka v době ukončení zkoušena) spadá do výsledku A (2 anebo více úhynů), postupuje se podle pravidla klasifikace v tabulce 2 s fixní dávkou 5 mg/kg (kategorie 1, pokud se vyskytnou dva a více úhynů nebo kategorie 2, pokud se nevyskytne více než 1 úhyn). Navíc je v tabulce 4 uvedeno poučení týkající se klasifikace v rámci systému EU, dokud nebude zaveden nový globálně harmonizovaný systém (GHS).

1.5.3 **Hlavní studie**

1.5.3.1 *Počet pokusných zvířat a úrovně dávek*

Kroky, podle kterých se má postupovat po provedení zkoušek s výchozí úrovní dávky, jsou uvedeny ve vývojovém diagramu v tabulce 2. Bude nutné zvolit jeden ze tří postupů: buď zkoušení ukončit a stanovit odpovídající klasifikační třídu nebezpečnosti, provést zkoušky s vyšší fixní dávkou nebo zkoušky s nižší fixní dávkou. Avšak s ohledem na ochranu pokusných zvířat se v hlavní studii znovu nepoužije úroveň dávky, která v orientační studii vedla k úhynutí (viz tabulka 2). Zkušenosti ukázaly, že nejpravděpodobnějším výsledkem u výchozí úrovně dávky bude, že látku lze klasifikovat bez nutnosti dalších zkoušek.

Obvykle se pro každou vyšetřovanou úroveň dávky použije celkem pět pokusných zvířat stejného pohlaví. Mezi těmito pěti pokusnými zvířaty bude jedno pokusné zvíře z orientační studie, jemuž byla podána zvolená úroveň dávky, a další čtyři pokusná zvířata (kromě výjimečných případů, kdy úroveň dávky použité v hlavní studii nebyla součástí orientační studie).

Časový interval mezi podáváním každé úrovně dávky závisí na době nástupu, trvání a závažnosti příznaků toxicity. Expozice pokusných zvířat další dávce by měla být odložena, dokud nebude jisté, že pokusná zvířata, jimž byla podána předchozí dávka, přežila. Mezi jednotlivými úrovněmi dávky se v případě potřeby doporučuje ponechat dobu 3 nebo 4 dnů, aby bylo umožněno pozorování zpožděné toxicity. Časový interval lze podle potřeby upravit, např. v případě neprůkazné reakce.

Při zvažování použití nejvyšší fixní dávky 5 000 mg/kg se postupuje podle metody popsané v tabulce 3 (viz také část 1.6.2).

1.5.3.2 *Limitní zkouška*

Limitní zkouška se používá především tehdy, má-li osoba provádějící zkoušku informace svědčící o tom, že zkoušený materiál je pravděpodobně netoxický, tj. je toxický pouze nad rámec regulačních limitních dávek. Informace o toxicitě zkoušeného materiálu lze získat ze znalostí o podobných zkoušených sloučeninách, směsích nebo prostředcích s ohledem na totožnost a procento složek, o nichž se ví, že jsou toxikologicky významné. V situacích, kdy existuje jen málo informací nebo vůbec žádné informace o toxicitě nebo kdy se očekává, že zkoušený materiál bude toxický, by měla být provedena hlavní zkouška.

Podle obvyklého postupu slouží jako limitní zkouška pro tyto pokyny výchozí dávka orientační studie 2 000 mg/kg (nebo výjimečně 5 000 mg/kg), po níž následuje podání této úrovně dávky dalším čtyřem pokusným zvířatům.

1.6 POZOROVÁNÍ

Po podání dávky se pokusná zvířata pozorují individuálně minimálně jednou během prvních 30 minut, pravidelně během prvních 24 h, přičemž zvláštní pozornost se věnuje prvním 4 h, a poté denně po dobu 14 dnů kromě případů, kdy je nutné pokusná zvířata ze studie vyjmout a humánně utratit kvůli dodržování pravidla dobrého zacházení s pokusnými zvířaty, nebo je zjištěn jejich úhyn. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Měla by být stanovena podle toxických reakcí, doby jejich nástupu a délky fáze zotavení, a může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, je důležitá zejména v případě tendence ke zpožděným příznakům toxicity^{7a)}. Veškerá

pozorování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou pro každé pokusné zvíře jednotlivě.

Další pozorování budou nutná, jestliže pokusná zvířata dále vykazují příznaky toxicity. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Pozornost je třeba věnovat třesu, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu^{7a)}. Pokusná zvířata ve stavu agónie a pokusná zvířata se známkami prudkých bolestí nebo s přetrvávajícími příznaky značného utrpení se humánně utratí. Pokud jsou pokusná zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je nutné dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

1.6.1 **Tělesná hmotnost**

Hmotnosti jednotlivých pokusných zvířat se stanoví krátce před podáním zkoušené látky a nejméně jednou týdně poté. Vypočítají se změny hmotnosti. Na konci zkoušky se pokusná zvířata, která přežila, zváží a poté humánně utratí.

1.6.2 **Patologie**

Všechna pokusná zvířata se pitvají. U každého pokusného zvířete se zaznamenají všechny makroskopické patologické nálezy. Lze také zvážit mikroskopické vyšetření orgánů, u nichž jsou patrné makroskopické změny.

2 **DATA**

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé pokusné zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých pokusných zvířat, počet pokusných zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet pokusných zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba uhynutí jednotlivých pokusných zvířat, popis a časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy.

3 **PROJEKT POKUSU, PROTOKOL POKUSU A ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA**

V souladu s příslušnými právními předpisy^{9),10)} musí být zpracován projekt pokusu a o průběhu pokusu je nutno vést protokol.

3.1 Zpráva o průběhu pokusu obsahuje tyto informace:

Zkoušená látka:

- fyzikální povaha, čistota a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně izomerizace),
- identifikační údaje, včetně čísla CAS.

Vehikulum (v případě potřeby):

- zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen,
- mikrobiologický stav pokusných zvířat, je-li znám,
- počet, stáří a pohlaví pokusných zvířat (případně včetně zdůvodnění použití samců místo samic),
- původ, podmínky chovu, krmivo atd.

Zkušební podmínky:

- podrobné údaje o složení zkoušené látky, včetně podrobností o fyzikální formě podávaného materiálu,
- podrobné údaje o způsobu podání zkoušené látky, včetně podávaných objemů a době podávání,
- podrobné údaje o krmivu a kvalitě vody (včetně druhu/zdroje krmiva, zdroje vody),
- zdůvodnění výběru výchozí dávky.

Výsledky:

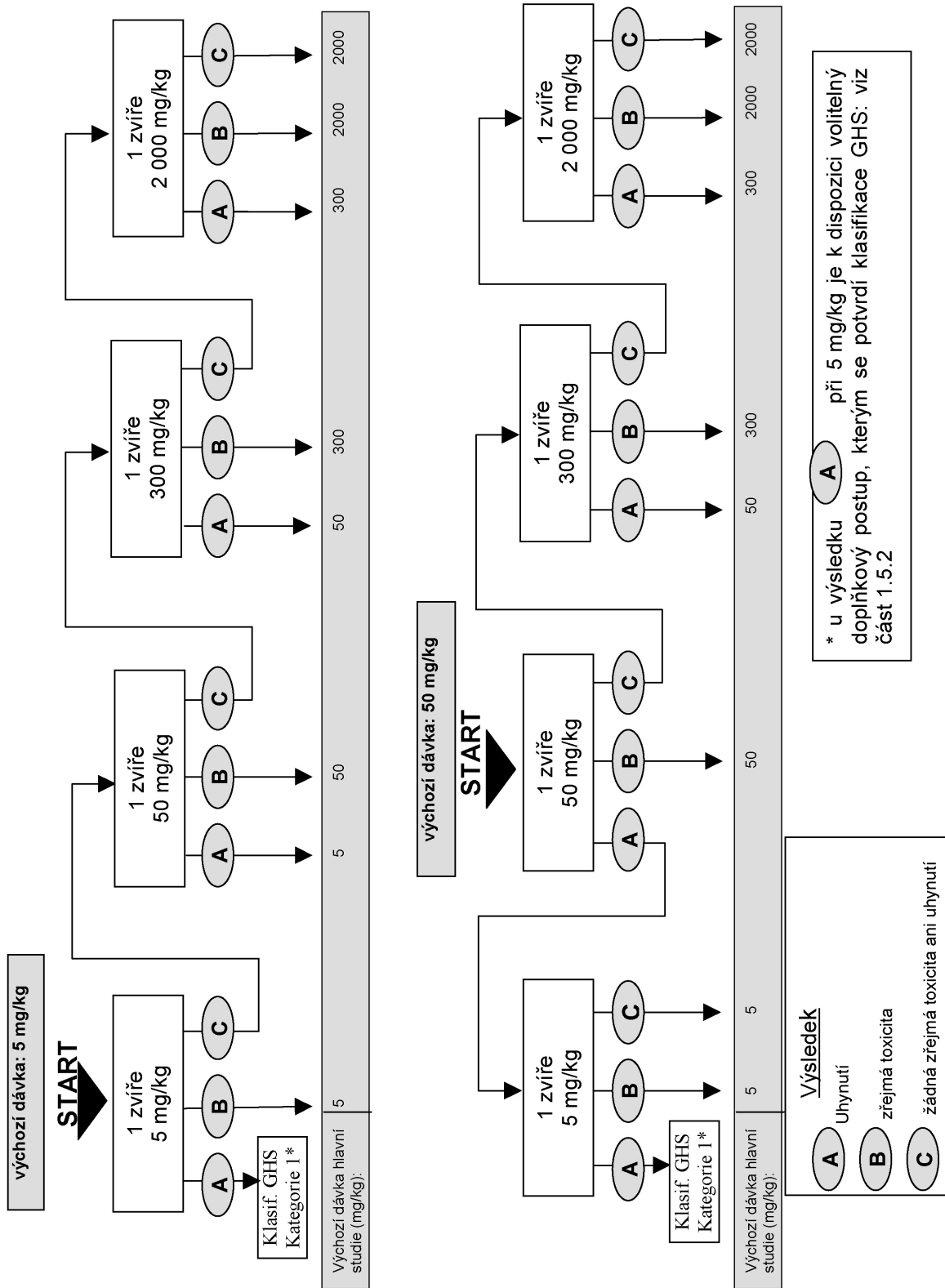
- tabulky údajů o reakcích každého pokusného zvířete a o jeho úrovni dávky (tj. počet pokusných zvířat vykazujících příznaky toxicity, včetně uhynutí, povahy, závažnosti a trvání účinků),

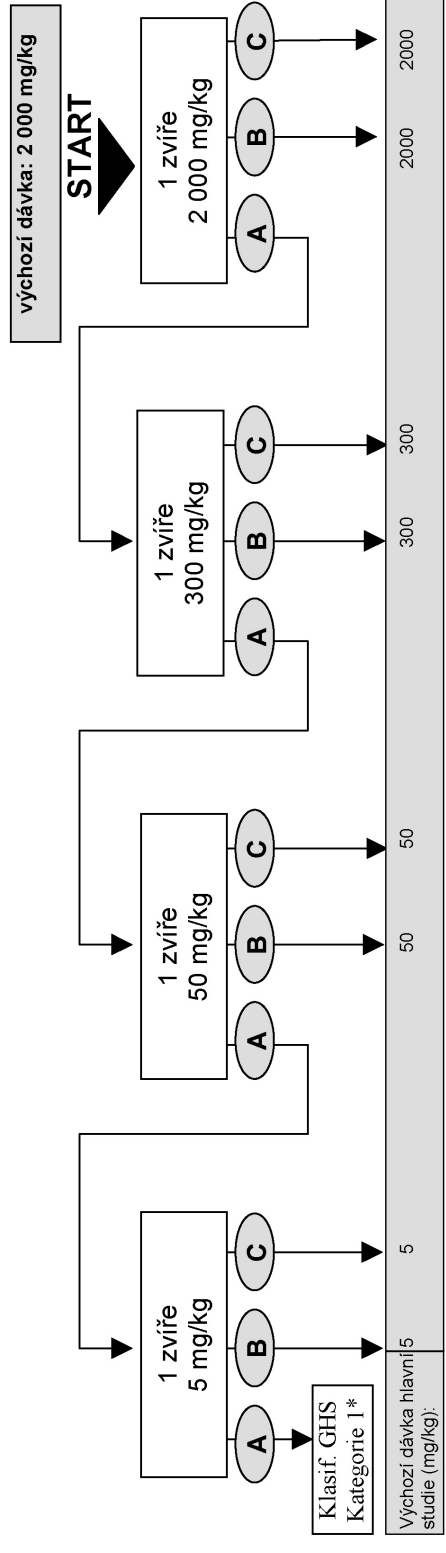
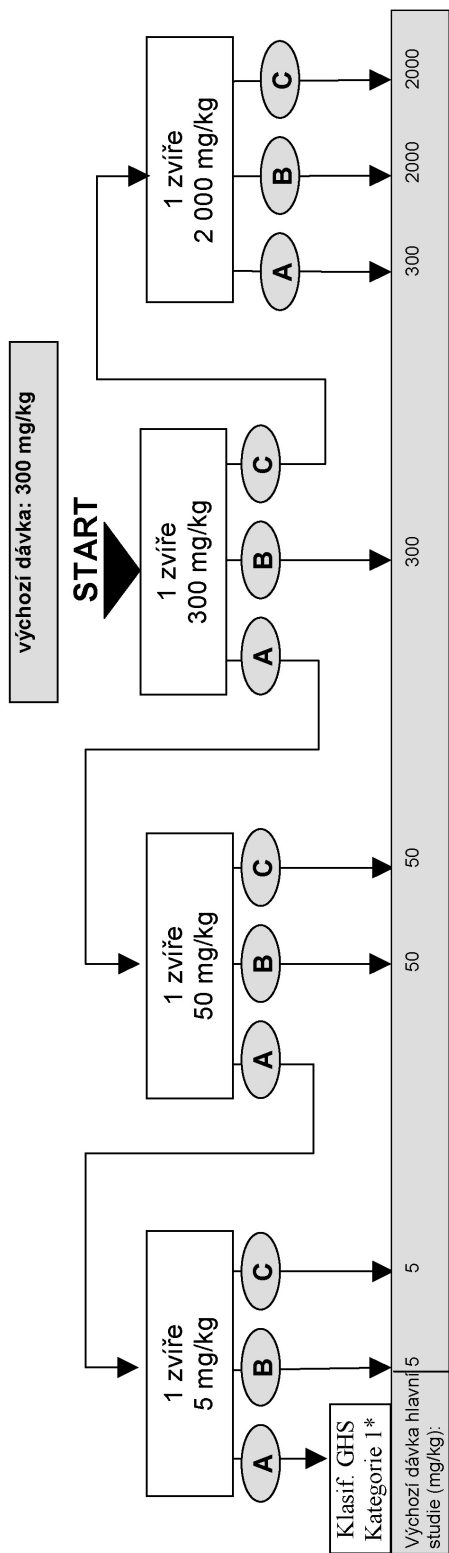
- tabulky údajů o tělesné hmotnosti a jejích změnách,
- individuální hmotnosti pokusných zvířat v den podání dávky, poté v týdenních intervalech a v čase úhynu nebo utracení,
- datum a doba úhynu, pokud předchází plánovanému usmrcení,
- časový průběh nástupu příznaků toxicity u každého pokusného zvířete a zda byly vratné,
- pitevní a histopatologické nálezy pro každé pokusné zvíře, pokud jsou k dispozici.

Diskuse a interpretace výsledků.

Závěry.

Tabulka 1: VÝVOJOVÝ DIAGRAM PRO ORIENTAČNÍ STUDII





Výsledek

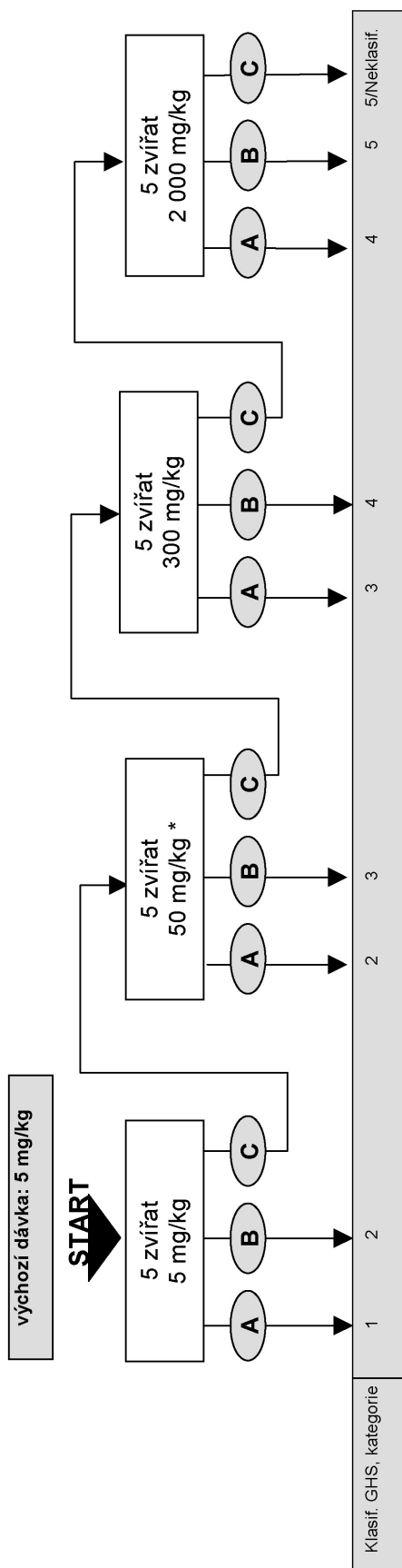
A uhynutí

B zřejmá toxicita

C žádná zřejmá toxicita ani uhynutí

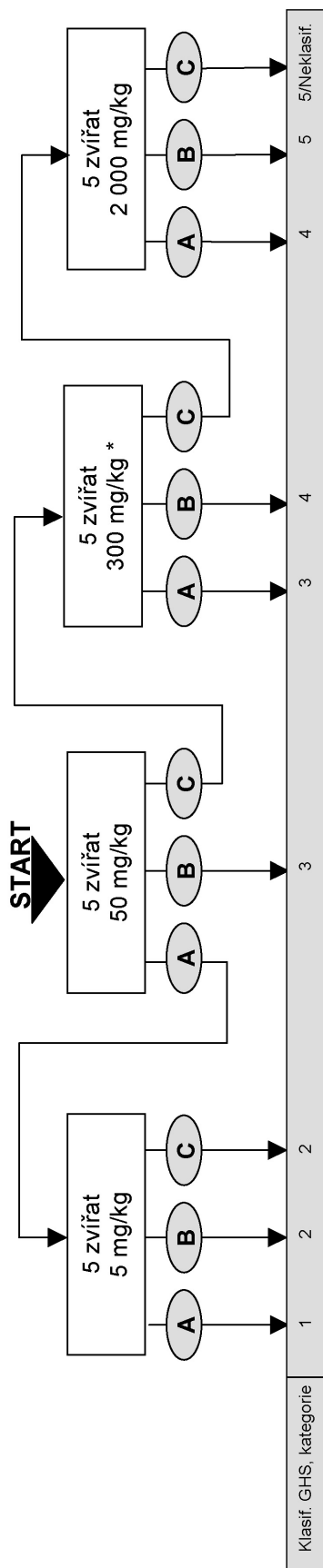
*u výsledku **A** při 5 mg/kg je k dispozici volitelný doplňkový postup, kterým se potvrdí klasifikace GHS: viz část 1.5.2

Tabulka 2: VÝVOJOVÝ DIAGRAM PRO HLAVNÍ STUDII



výchozí dávka: 50 mg/kg

START



Výsledek

A uhynutí

B ≥ 1 se zřejmou toxicitou nebo 1 uhynutí

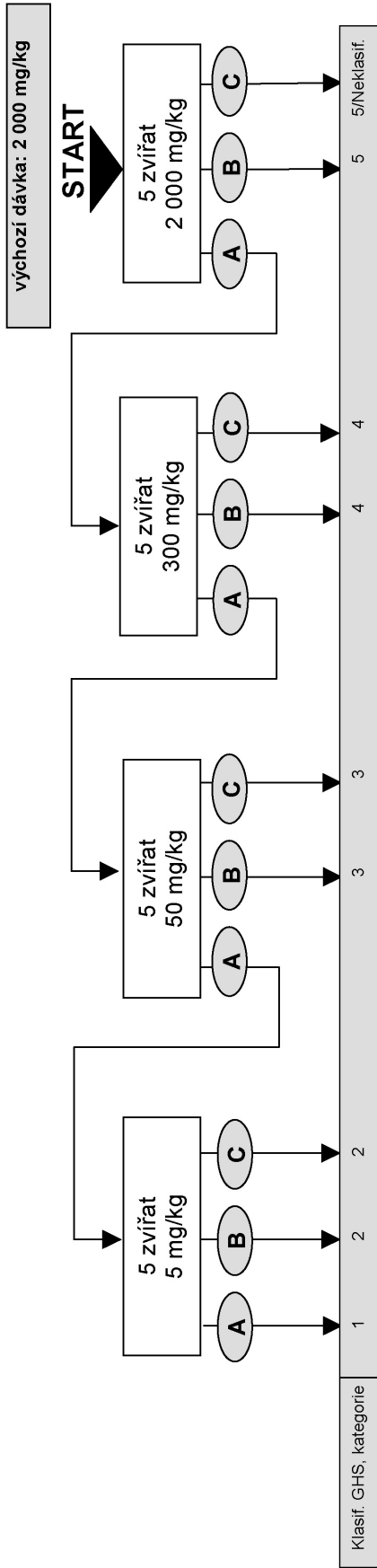
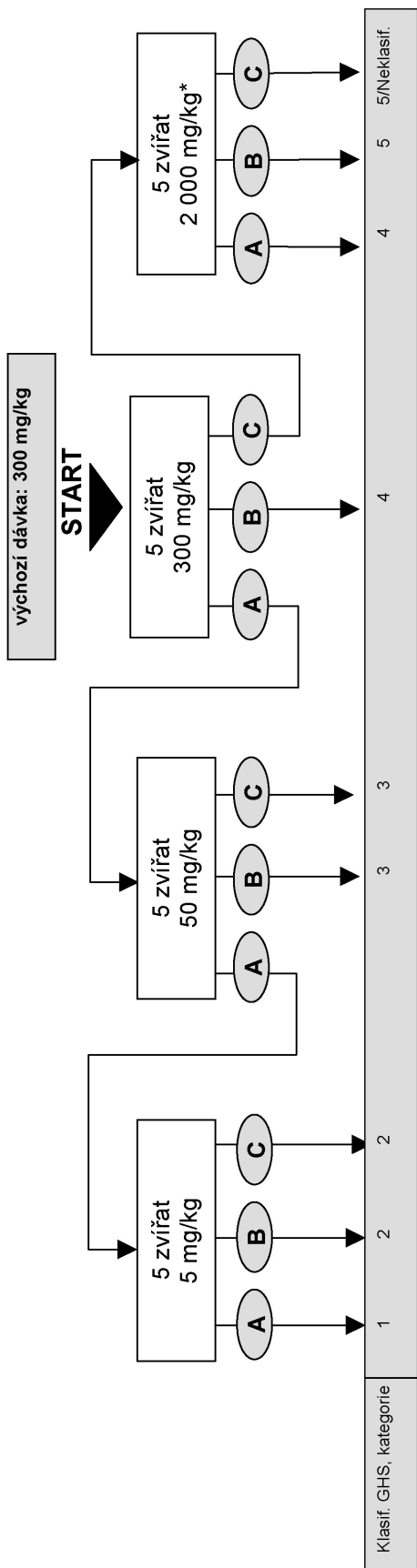
C žádná zřejmá toxicita ani uhynutí

Velikost skupiny

Mezi 5 zvířaty v každé skupině v hlavní studii bude zvíře, jemuž byla v orientační studii podána tato úroveň dávky.

***Pravidlo dobrého zacházení se zvířaty**

Pokud v orientační studii u této dávky uhynulo zvíře, další zkoušení se neprovede. Přejděte rovnou k výsledku **A**



Výsledek

A ≥ 2 uhynutí

B ≥ 1 se zřejmou toxicitou a/nebo 1 uhynutí

C žádná zřejmá toxicita ani uhynutí

Velikost skupiny
Mezi 5 zvířaty v každé skupině v hlavní studii bude zvíře, jemuž byla v orientační studii podána tato úroveň dávky.

***Pravidlo dobrého zacházení se zvířaty**
Pokud v orientační studii u této dávky uhynulo zvíře, další zkoušení se neprovede. Přejděte rovnou k výsledku **A**

Tabulka 3**KRITÉRIA KLASIFIKACE ZKOUŠENÝCH LÁTEK S OČEKÁVANÝMI HODNOTAMI LD₅₀ PŘESAHOJÍCÍMI 2 000 mg/kg BEZ NUTNOSTI ZKOUŠENÍ**

Kritéria pro kategorii nebezpečnosti 5 mají umožnit identifikaci zkoušených látek, u nichž je nebezpečí akutní toxicity nízké, avšak které mohou za určitých okolností pro citlivé jedince představovat nebezpečí. U těchto látek se předpokládá, že se jejich orální nebo dermální LD₅₀ nebo LD₅₀ ekvivalentních dávek podávaných jinými cestami pohybuje v rozmezí od 2 000 do 5 000 mg/kg. Zkoušené látky lze klasifikovat v kategorii nebezpečnosti definované jako $2\,000\text{ mg/kg} < LD_{50} < 5\,000\text{ mg/kg}$ (v GHS kategorie 5) v těchto případech:

- a) pokud je do této kategorie zařazena podle některého ze systémů zkoušení uvedeného v tabulce 2, v závislosti na výskytech uhynutí,
- b) pokud jsou již k dispozici spolehlivé důkazy naznačující, že LD₅₀ se pohybuje v rozmezí hodnot kategorie 5, nebo pokud z jiných studií na pokusných zvířatech nebo z toxických účinků na člověka vyplývají akutní obavy o lidské zdraví,
- c) pokud extrapolací, odhadem nebo měřením údajů není přiřazení do vyšší třídy nebezpečnosti odůvodněno, a
 - pokud jsou k dispozici spolehlivé informace naznačující významné toxické účinky na člověka, nebo
 - pokud je během zkoušení orální cestou do hodnot kategorie 4 pozorováno uhynutí, nebo
 - v případech, kdy odborný posudek potvrdí závažné klinické příznaky toxicity při testování do hodnot kategorie 4 s výjimkou průjmu, piloerekce nebo rozčuchané srsti, nebo
 - v případech, kdy odborný posudek potvrdí spolehlivé informace, které naznačují potenciál pro významné akutní účinky vyplývající z jiných studií na pokusných zvířatech.

ZKOUŠENÍ V DÁVKÁCH PŘESAHOJÍCÍCH 2 000 mg/kg

Ve výjimečných případech, a pouze je-li to odůvodněno specifickými regulačními potřebami, lze zvážit použití další nejvyšší úrovně fixní dávky 5 000 mg/kg. S ohledem na potřebu ochrany dobrého zacházení s pokusnými zvířaty se zkoušení v dávkách 5 000 mg/kg nedoporučuje a mělo by se zvažovat pouze v případě, že existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky by měly přímý význam pro ochranu pokusných zvířat nebo lidského zdraví^{7a)}.

Orientační studie

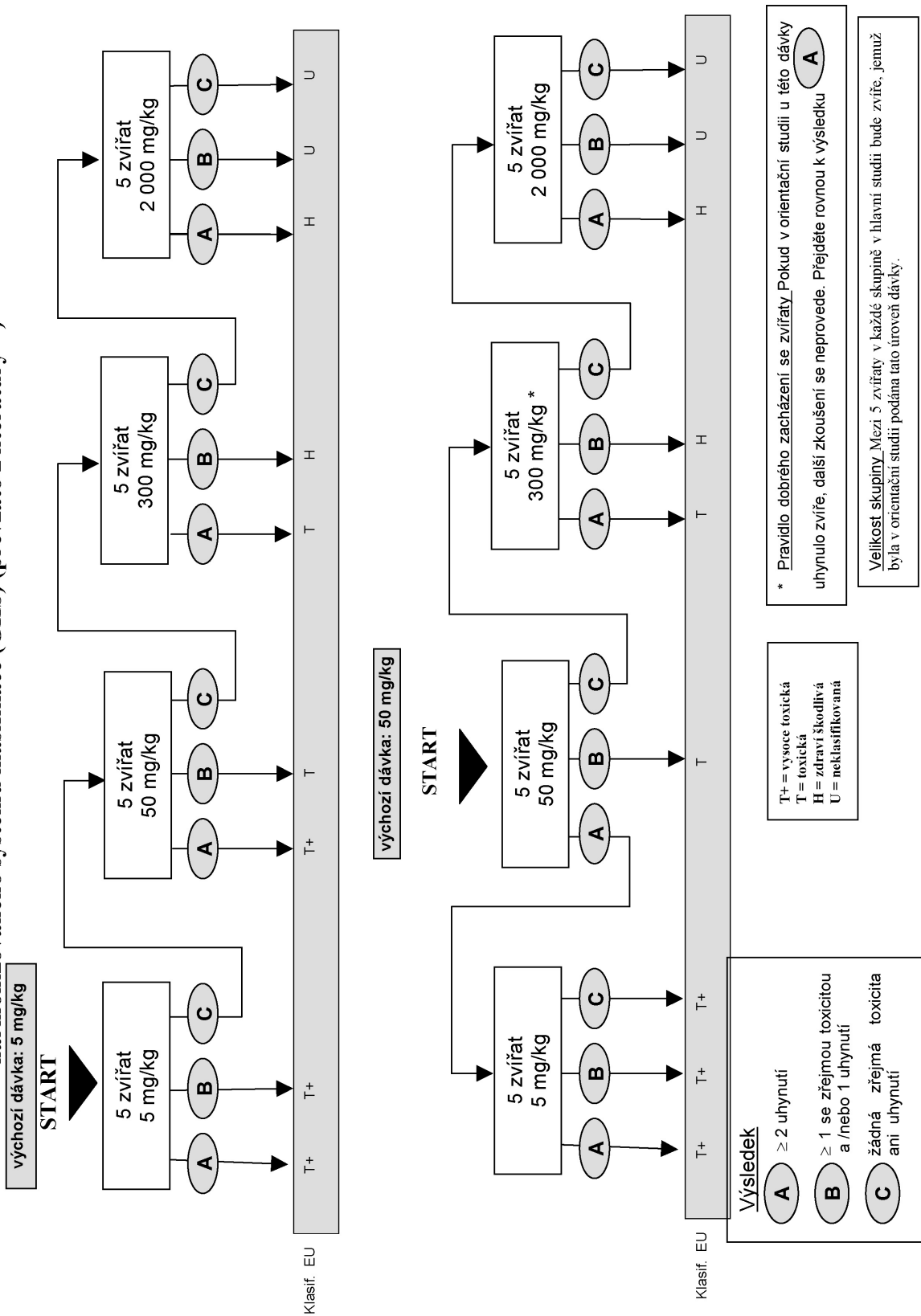
Pravidla pro rozhodování, jimiž se řídí metoda postupného podávání dávek uvedená v tabulce 1, se rozšíří tak, aby zahrnovala úroveň dávky 5 000 mg/kg. Pokud se v orientační studii použije výchozí dávka 5 000 mg/kg, výsledek A (úhyn) povede k nutnosti zkoušet na druhém pokusném zvířeti dávku 2 000 mg/kg. Výsledky B a C (zřejmá toxicita nebo žádná toxicita) umožní zvolit dávku 5 000 mg/kg za výchozí dávku hlavní studie. Podobně pokud se použije výchozí dávka jiná než 5 000 mg/kg, zkoušení pokračuje na úroveň 5 000 mg/kg v případě, že se při 2 000 mg/kg zjistí výsledky B nebo C. Následný výsledek A při 5 000 mg/kg bude vyžadovat výchozí dávku hlavní studie 2 000 mg/kg a výsledky B a C budou vyžadovat výchozí dávku v hlavní studii 5 000 mg/kg.

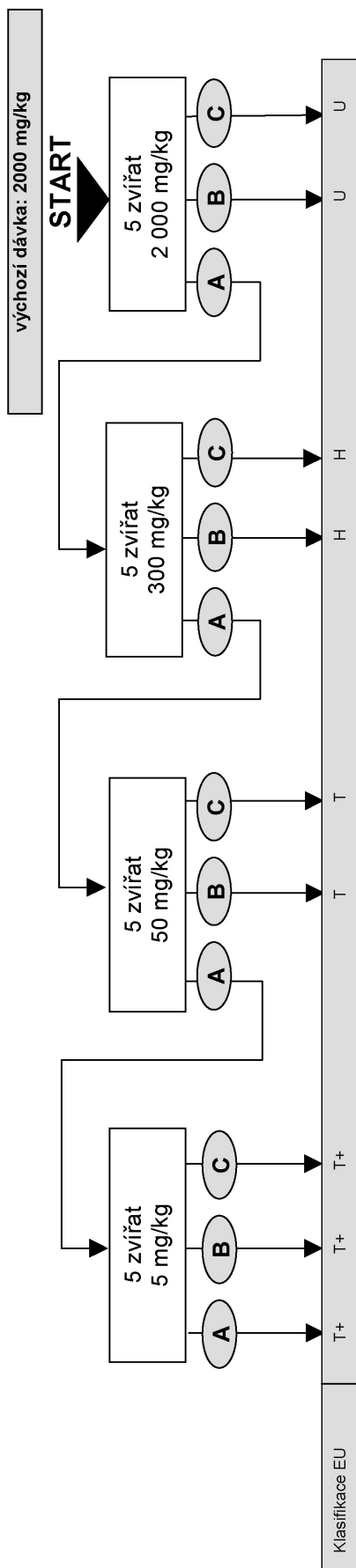
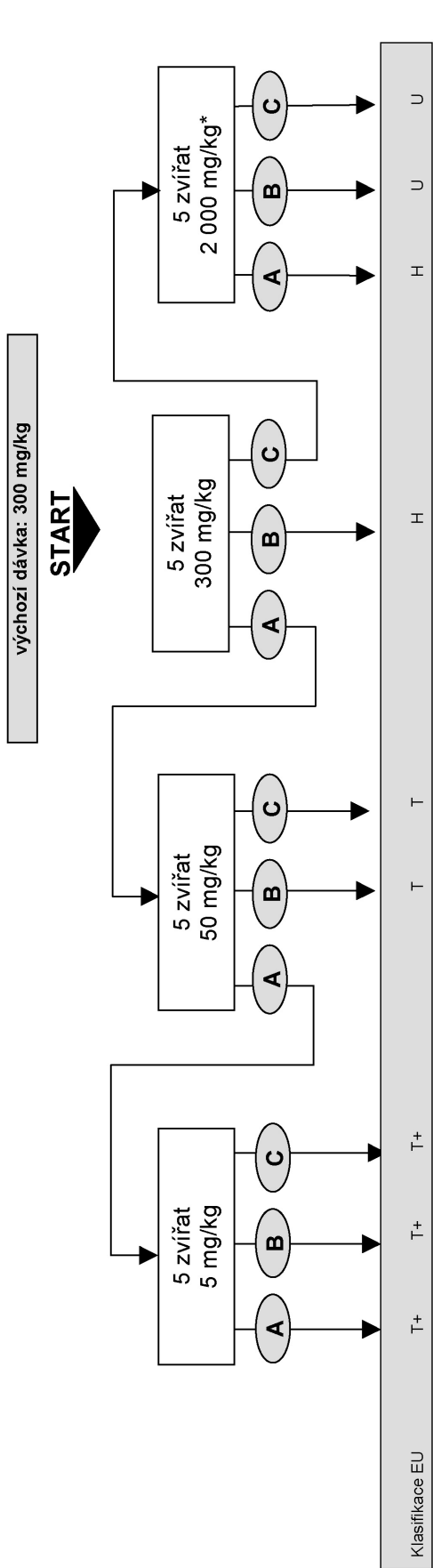
Hlavní studie

Pravidla pro rozhodování, jimiž se řídí metoda postupného podávání dávek uvedená v tabulce 2, se rozšíří tak, aby zahrnovala úroveň dávky 5 000 mg/kg. Pokud se tedy v hlavní studii použije výchozí dávka 5 000 mg/kg, bude výsledek A (≥ 2 úhyny) vyžadovat zkoušení dávky 2 000 mg/kg na druhé skupině. Výsledek B (zřejmá toxicita nebo ≤ 1 úhyn) nebo C (žádná toxicita) povedou k tomu, že látka nebude podle GHS klasifikována. Podobně pokud se použije výchozí dávka jiná než 5 000 mg/kg, zkoušení pokračuje na úroveň 5 000 mg/kg v případě, že se při 2 000 mg/kg zjistí výsledek C. Následný výsledek A při 5 000 mg/kg povede k tomu, že se látka přiřadí do kategorie 5 GHS a na základě výsledku B nebo C látka nebude klasifikována.

Tabulka 4

ZKUŠEBNÍ METODA B.1 bis – Pokyny ke klasifikaci podle systému EU pro přechodné období do plného zavedení globálně harmonizovaného systému klasifikace (GHS) (převzato z literatury^{7(a)})





Velikost skupiny
Mezi 5 zvířaty v každé skupině v hlavní studii bude zvíře, jemuž byla v orientační studii podána tato úroveň dávky.

***Pravidlo dobrého zacházení se zvířaty**
Pokud v orientační studii u této dávky uhynulo zvíře, další zkoušení se neprovede. Přejdete rovnou k výsledku **A**

Výsledek

A ≥ 2 uhynutí

B ≥ 1 se zřejmou toxicitou a/nebo 1 uhynutí

C žádná zřejmá toxicita ani uhynutí

6. V příloze č. 2 metoda B.1 tris AKUTNÍ TOXICITA ORÁLNÍ (PER OS) METODA STANOVENÍ TŘÍDY AKUTNÍ TOXICITY zní:

„B.1 tris AKUTNÍ TOXICITA ORÁLNÍ – METODA STANOVENÍ TŘÍDY AKUTNÍ TOXICITY

1 METODA je v souladu s právem Evropských společenství^{7a)}.

1.1 ÚVOD

Metoda stanovení třídy akutní toxicity^{7a)} stanovená v této zkoušce je metodou po krocích, přičemž u každého kroku se používají 3 pokusná zvířata stejného pohlaví. V závislosti na mortalitě nebo stavu agónie pokusných zvířat lze o akutní toxicitě zkoušené látky rozhodnout průměrně na základě 2 až 4 kroků. Tato metoda je reprodukovatelná, vyžaduje méně pokusných zvířat a dokáže látky zařadit podobně jako jiné metody zkoušení akutní toxicity. Metoda stanovení třídy akutní toxicity je založena na biometrickém hodnocení^{7a)} s fixními dávkami, přiměřeně oddělenými tak, aby umožnila zařazení látky pro účely klasifikace a posouzení nebezpečnosti. Na metodu přijatou v roce 1996 byly provedeny rozsáhlé národní^{7a)} i mezinárodní^{7a)} validační studie *in vivo* pro srovnání s hodnotami LD₅₀ získanými z literatury.

Není nutné podávat zkoušené látky v dávkách, o nichž je známo, že v důsledku leptavých nebo výrazně dráždivých účinků vyvolávají značnou bolest a utrpení. Umírající pokusná zvířata nebo pokusná zvířata, která zjevně projevují příznaky bolesti nebo značného a přetrvávajícího utrpení, se humánně utratí a při interpretaci výsledků jsou hodnocena jako pokusná zvířata uhynulá při zkoušce. Kritéria rozhodování o utracení umírajících nebo značně trpících pokusných zvířat a poučení týkající se rozpoznání předvídatelného nebo blížícího se uhynutí lze nalézt v literatuře^{7a)}.

Metoda využívá předem stanovených dávek a její výsledky umožňují látku zařadit a klasifikovat podle globálně harmonizovaného systému klasifikace chemických látek, které způsobují akutní toxicitu^{7a)}.

V zásadě tato metoda neslouží k vypočtení přesné hodnoty LD₅₀, ale umožňuje určit definované rozpětí expozice, při které se předpokládá letalita, neboť hlavním koncovým vyhodnocením této zkoušky zůstává uhynutí části pokusných zvířat. Metoda umožňuje stanovit hodnotu LD₅₀, pouze pokud alespoň dvě dávky vedou k mortalitě vyšší než 0 % a nižší než 100 %. Použití výběru předem stanovených dávek bez ohledu na zkoušenou látku, u něhož se klasifikace explicitně váže k počtu pokusných zvířat pozorovaných v různých stavech, zvyšuje možnost konzistentního a opakovaného předávání zpráv mezi laboratořemi.

Zkušební laboratoř by před provedením studie měla vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené látce. Součástí těchto informací je

totožnost a chemická struktura látky, její fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledek jiných zkoušek toxicity dané látky *in vivo* nebo *in vitro*, toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách a očekávané použití látky. Tyto informace jsou nezbytné k tomu, aby byli všichni zainteresovaní přesvědčeni, že zkouška má význam pro ochranu lidského zdraví a pomůže při výběru nejvhodnější výchozí dávky.

1.2 DEFINICE

Akutní orální toxicita: vztahuje se na nepříznivé účinky, které se projeví po orálním podání jedné dávky nebo více dávek látky během 24 h.

1.3 PODSTATA ZKOUŠKY

Podstatou zkoušky je to, že se pomocí metody po krocích využívající minimálního počtu pokusných zvířat u každého kroku získají informace o akutní toxicitě zkoušené látky, které umožní její klasifikaci. Látka se skupině pokusných zvířat podává orálně v jedné ze stanovených dávek. Látka se zkouší metodou po krocích, přičemž u každého kroku se používají tři pokusná zvířata stejného pohlaví (obvykle samice). Přítomnost nebo nepřítomnost mortality vyvolané látkou u pokusných zvířat, jimž byla látka podána v jednom kroku, rozhodne o dalším kroku, tj.:

- není třeba žádné další zkoušení,
- podá se stejná dávka dalším třem pokusným zvířatům,
- látka se podá dalším třem pokusným zvířatům v nejbližší vyšší nebo nejbližší nižší úrovni dávky.

Podrobnosti postupu zkoušení jsou uvedeny v tabulce 5. Metoda umožní rozhodnout s ohledem na zařazení zkoušené látky do jedné z řady tříd toxicity definovaných fixními hraničními hodnotami LD₅₀.

1.4 POPIS METODY

1.4.1 Výběr druhu pokusných zvířat

Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan, avšak lze použít i jiné druhy hlodavců. Obvykle se používají samice^{7a)}. Je to proto, že přehled literatury o konvenčních zkouškách LD₅₀ ukazuje, že ačkoliv je mezi pohlavími obvykle malý rozdíl, pokud jde o citlivost, jsou samice v případech, ve kterých jsou rozdíly pozorovány, obecně nepatrně citlivější^{7a)}. Pokud však poznatky o toxikologických nebo toxikokinetických vlastnostech strukturně příbuzných chemických látek naznačují, že citlivější jsou pravděpodobně samci, použije se toto pohlaví. Jestliže se zkouška provádí na samcích, je nutné podat náležité odůvodnění. Použijí se mladá zdravá dospělá pokusná zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Každé pokusné zvíře musí být na začátku podávání látky 8 až

12 týdnů staré a jeho hmotnost by se měla pohybovat v intervalu $\pm 20\%$ střední hmotnosti pokusných zvířat, kterým byla podána předchozí dávka.

1.4.2 **Podmínky chovu a krmení**

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být $(22 \pm 3)^\circ\text{C}$. Ačkoliv by relativní vlhkost měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50 – 60 %. Osvětlení by mělo být umělé, mělo by se střídát 12 h světla a 12 h tmy, není-li v chovné místnosti denní světlo. Ke krmení lze použít obvyklé krmivo určené pro pokusná zvířata od registrovaného výrobce s neomezenou dodávkou pitné vody. Pokusná zvířata mohou být chována v klecích ve skupinách podle dávky v souladu s příslušným právním předpisem¹⁰⁾, pokud není stanoveno projektem pokusů jinak, ale počet pokusných zvířat v kleci nesmí bránit nerušenému pozorování každého pokusného zvířete.

1.4.3 **Příprava pokusných zvířat**

Pokusná zvířata jsou vybrána s ohledem na druh, pohlaví a stáří v souladu s ustanovením § 15 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾ a označena tak, aby byla možná identifikace jednotlivých pokusných zvířat. Dobu navykání stanoví § 10 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾.

1.4.4 **Příprava dávek**

Zkoušená látka by obecně měla být při všech úrovních zkoušených dávek podávána v konstantním objemu pomocí úpravy koncentrace dávkovaného přípravku. V případech, kdy má být zkoušen kapalný konečný produkt nebo směs, může však mít použití nezředěné zkoušené látky, tj. s konstantní koncentrací, větší závažnost pro hodnocení následného rizika této látky. Ani v jednom případě nesmí být překročen maximální objem dávky. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. U hlodavců by objem obvykle neměl přesáhnout 1 ml/100 g tělesné hmotnosti: avšak u vodných roztoků připadá v úvahu i dávka 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. S ohledem na složení dávkovaného přípravku se ve všech případech, kde je to možné, doporučuje použití vodného roztoku/suspenze/emulze, potom v pořadí podle preference použití roztoku/suspenze/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec případně roztoku v jiných vehikulech. U vehikul jiných než voda musí být známy jejich toxikologické charakteristiky. Dávky musí být připraveny krátce před podáním, pokud není stálost přípravku během doby, kdy bude používán, známa a neukáže se jako přijatelná.

1.5 POSTUP

1.5.1 Podávání dávek

Zkoušená látka se podává sondou v jedné dávce pomocí žaludeční sondy nebo vhodné intubační rourky. Pokud výjimečně není možné podat dávku najednou, lze dávku podat po menších množstvích během nejvýše 24 h.

Před podáním zkoušené látky nemají pokusná zvířata dostávat krmivo (např. potkanům by se nemělo podávat přes noc, myším 3 – 4 h), voda se však ponechává. Po uplynutí doby hladovění se pokusná zvířata zváží a podá se jim zkoušená látka. Po podání látky se zamezí přístupu ke krmivu na další 3 – 4 h u potkanů nebo 1 – 2 h u myši. Podává-li se látka po částech v průběhu určité doby, může být podle délky období nezbytné poskytnout pokusným zvířatům krmivo a vodu.

1.5.2 Počet pokusných zvířat a úrovně dávek

V každém kroku se používají tři pokusná zvířata. Dávka, která bude použita jako výchozí, se zvolí z jedné ze čtyř fixních úrovní: 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Výchozí dávka by měla být taková, která nejpravděpodobněji vyvolá úhynutí některých pokusných zvířat, jimž byla podána. Postup, který je nutno u každé výchozí dávky dodržet, je popsán ve vývojových diagramech v tabulce 5. Navíc je v tabulce 7 uvedeno poučení týkající se klasifikace v rámci systému EU, dokud nebude zaveden nový globálně harmonizovaný systém (GHS).

Pokud dostupné informace naznačují, že mortalita nebude pravděpodobně při nejvyšší výchozí úrovni dávky (2 000 mg/kg tělesné hmotnosti) vyvolána, je nutné provést limitní zkoušku. Pokud nejsou o látce, která má být testována, k dispozici žádné informace, doporučuje se kvůli dodržování pravidla dobrého zacházení s pokusnými zvířaty použít výchozí dávku 300 mg/kg tělesné hmotnosti.

Časový interval mezi experimentálními skupinami závisí na době nástupu, trvání a závažnosti příznaků toxicity. Expozice pokusných zvířat další dávce by měla být odložena, dokud nebude jisté, že pokusná zvířata, jimž byla podána předchozí dávka, přežila.

Ve výjimečných případech a pouze je-li to odůvodněno specifickými regulačními potřebami, lze zvážit použití další nejvyšší úrovně dávky 5 000 mg/kg tělesné hmotnosti (viz tabulka 6). S ohledem na dobré zacházení s pokusnými zvířaty se pokusy na pokusných zvířatech v rámci kategorie 5 GHS (2 000 – 5 000 mg/kg) nedoporučují a měly by se zvažovat pouze tehdy, pokud existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky budou mít přímý význam pro ochranu lidského zdraví, zdraví pokusných zvířat nebo životního prostředí.

1.5.3 Limitní zkouška

Limitní zkouška se používá především tehdy, má-li osoba provádějící zkoušku informace svědčící o tom, že zkoušený materiál je pravděpodobně netoxický, tj. je toxický pouze nad rámec regulačních limitních dávek. Informace o toxicitě zkoušeného materiálu lze získat ze znalostí o podobných zkoušených sloučeninách, směsích nebo prostředcích s ohledem na totožnost a procento složek, o nichž se ví, že jsou toxikologicky významné. V situacích, kdy existuje jen málo informací nebo vůbec žádné informace o toxicitě nebo kdy se očekává, že zkoušený materiál bude toxický, by měla být provedena hlavní zkouška.

Limitní zkoušku s jednou úrovní dávky 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti lze provést na šesti pokusných zvířatech (tři pokusná zvířata na jeden krok). Výjimečně lze na třech pokusných zvířatech provést limitní zkoušku s jednou úrovní dávky 5 000 mg/kg (viz tabulka 6). Projeví-li se mortalita vyvolaná zkoušenou látkou, může být nutné provést další zkoušky s nejbližší nižší úrovní dávky.

1.6 POZOROVÁNÍ

Po podání dávky se pokusná zvířata pozorují individuálně minimálně jednou během prvních 30 minut, pravidelně během prvních 24 h, přičemž zvláštní pozornost se věnuje prvním 4 h, a poté denně po dobu 14 dnů kromě případů, kdy je nutné pokusná zvířata ze studie vyjmout a humánně utratit kvůli dodržování pravidla dobrého zacházení s pokusnými zvířaty, nebo je zjištěn jejich úhyn. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Měla by být stanovena podle toxických reakcí, doby jejich nástupu a délky fáze zotavení, a může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, je důležitá zejména v případě tendence ke zpožděným příznakům toxicity^{7a)}. Veškerá pozorování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou pro každé pokusné zvíře jednotlivě.

Další pozorování bude nutné, jestliže pokusná zvířata dále vykazují příznaky toxicity. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Pozornost je třeba věnovat třesu, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu^{7a)}. Pokusná zvířata ve stavu agónie a pokusná zvířata se známkami prudkých bolestí nebo přetrvávajícími příznaky značného utrpení se humánně utratí. Pokud jsou pokusná zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je nutné dobu uhytnutí zaznamenat co nejpřesněji.

1.6.1 Tělesná hmotnost

Hmotnosti jednotlivých pokusných zvířat se stanoví krátce před podáním zkoušené látky a nejméně jednou týdně poté. Vypočítají se změny hmotnosti a zaznamenají se. Na konci zkoušky se pokusná zvířata, která přežila, zváží a humánně utratí.

1.6.2 Patologie

Všechna pokusná zvířata (včetně těch, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena kvůli dodržování pravidla dobrého zacházení s pokusnými zvířaty) se pitvají. U každého pokusného zvířete se zaznamenají všechny makroskopické patologické nálezy. Lze také zvážit mikroskopické vyšetření orgánů, u nichž jsou patrné makroskopické patologie, u pokusných zvířat, která přežila 24 nebo více hodin, protože mohou poskytnout užitečné informace.

2 DATA

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé pokusné zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých pokusných zvířat, počet pokusných zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet pokusných zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humanitních důvodů, doba uhynutí jednotlivých pokusných zvířat, popis a časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy.

3 PROJEKT POKUSU, PROTOKOL POKUSU A ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

V souladu s příslušnými právními předpisy^{9),10)} musí být zpracován projekt pokusu a o průběhu pokusu je nutno vést protokol.

3.1 Zpráva o průběhu pokusu obsahuje tyto informace:

Zkoušená látka:

- fyzikální povaha, čistota a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně izomerizace),
- identifikační údaje, včetně čísla CAS.

Vehikulum (v případě potřeby):

- zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen,
- mikrobiologický stav pokusných zvířat, je-li znám,
- počet, stáří a pohlaví pokusných zvířat (případně včetně zdůvodnění použití samců místo samic),
- původ, podmínky chovu, krmivo atd.

Zkušební podmínky:

- podrobné údaje o složení zkoušené látky, včetně podrobností o fyzikální formě podávaného materiálu,
- podrobné údaje o způsobu podání zkoušené látky, včetně podávaných objemů a době podávání,
- podrobné údaje o krmivu a kvalitě vody (včetně druhu/zdroje krmiva, zdroje vody),
- zdůvodnění výběru výchozí dávky.

Výsledky:

- tabulky údajů o reakcích každého pokusného zvířete a o úrovni jeho dávky (tj. počet pokusných zvířat vykazujících příznaky toxicity, včetně úhynutí, povahy, závažnosti a trvání účinků),
- tabulky údajů o tělesné hmotnosti a jejích změnách,
- individuální hmotnosti pokusných zvířat v den podání dávky, poté v týdenních intervalech a v čase úhynu nebo utracení,
- datum a doba úhynu, pokud předchází plánovanému usmrcení,
- časový průběh nástupu příznaků toxicity u každého pokusného zvířete a zda byly vratné,
- pitevní a histopatologické nálezy pro každé pokusné zvíře, pokud jsou k dispozici.

Diskuse a interpretace výsledků.

Závěry.

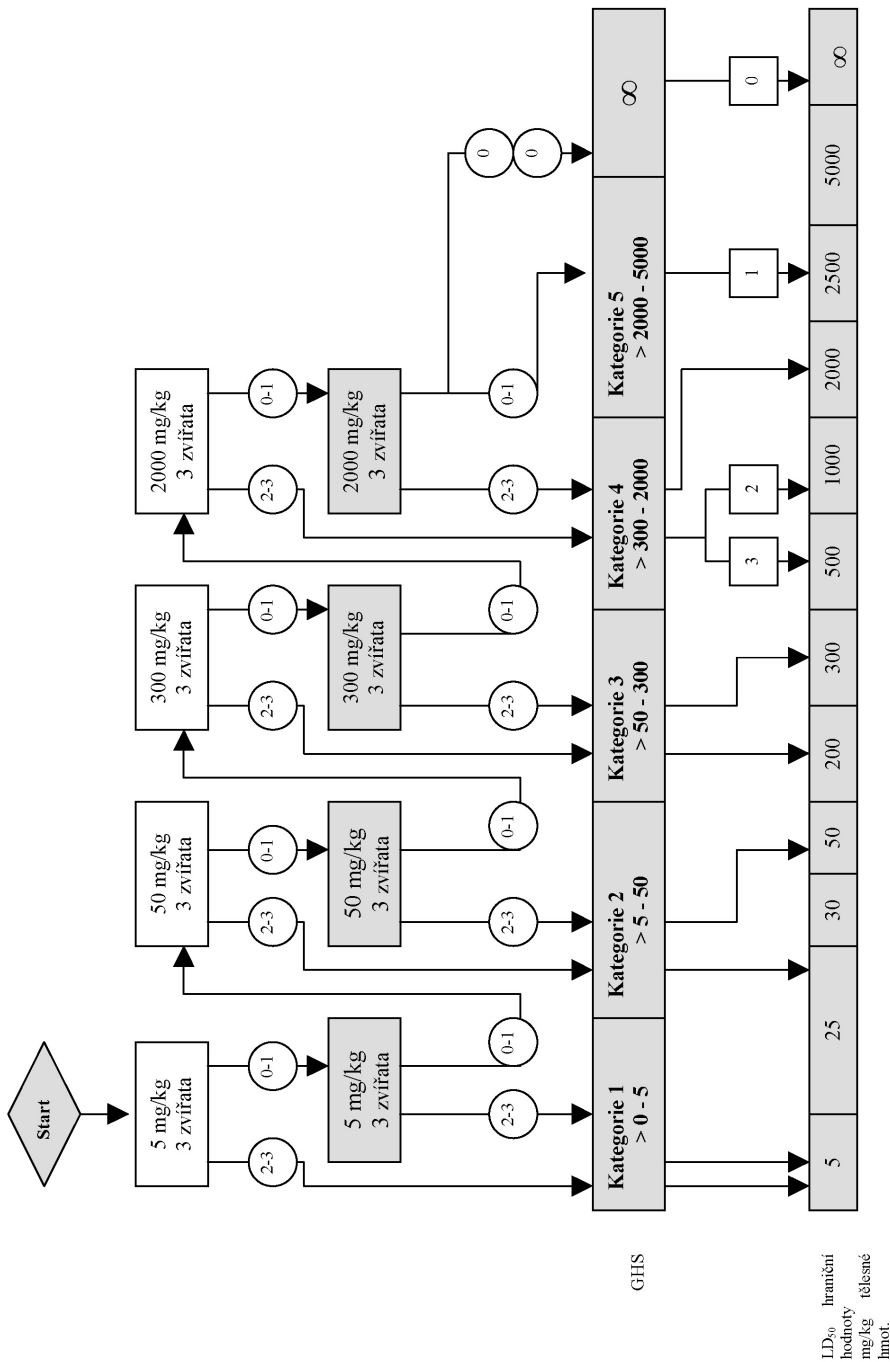
Tabulka 5**POSTUP, KTERÝ MÁ BÝT U KAŽDÉ Z VÝCHOZÍCH DÁVEK DODRŽEN***OBECNÉ POZNÁMKY*

System zkoušení u každé výchozí dávky obsažený v této tabulce nastiňuje postup, podle kterého je třeba postupovat.

- Tabulka 5 a: výchozí dávka je 5 mg /kg tělesné hmotnosti
- Tabulka 5 b: výchozí dávka je 50 mg /kg tělesné hmotnosti
- Tabulka 5 c: výchozí dávka je 300 mg/kg tělesné hmotnosti
- Tabulka 5 d: výchozí dávka je 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti

Postup zkoušení se řídí naznačenými šipkami v závislosti na počtu humánně utracených nebo uhynulých pokusných zvířat.

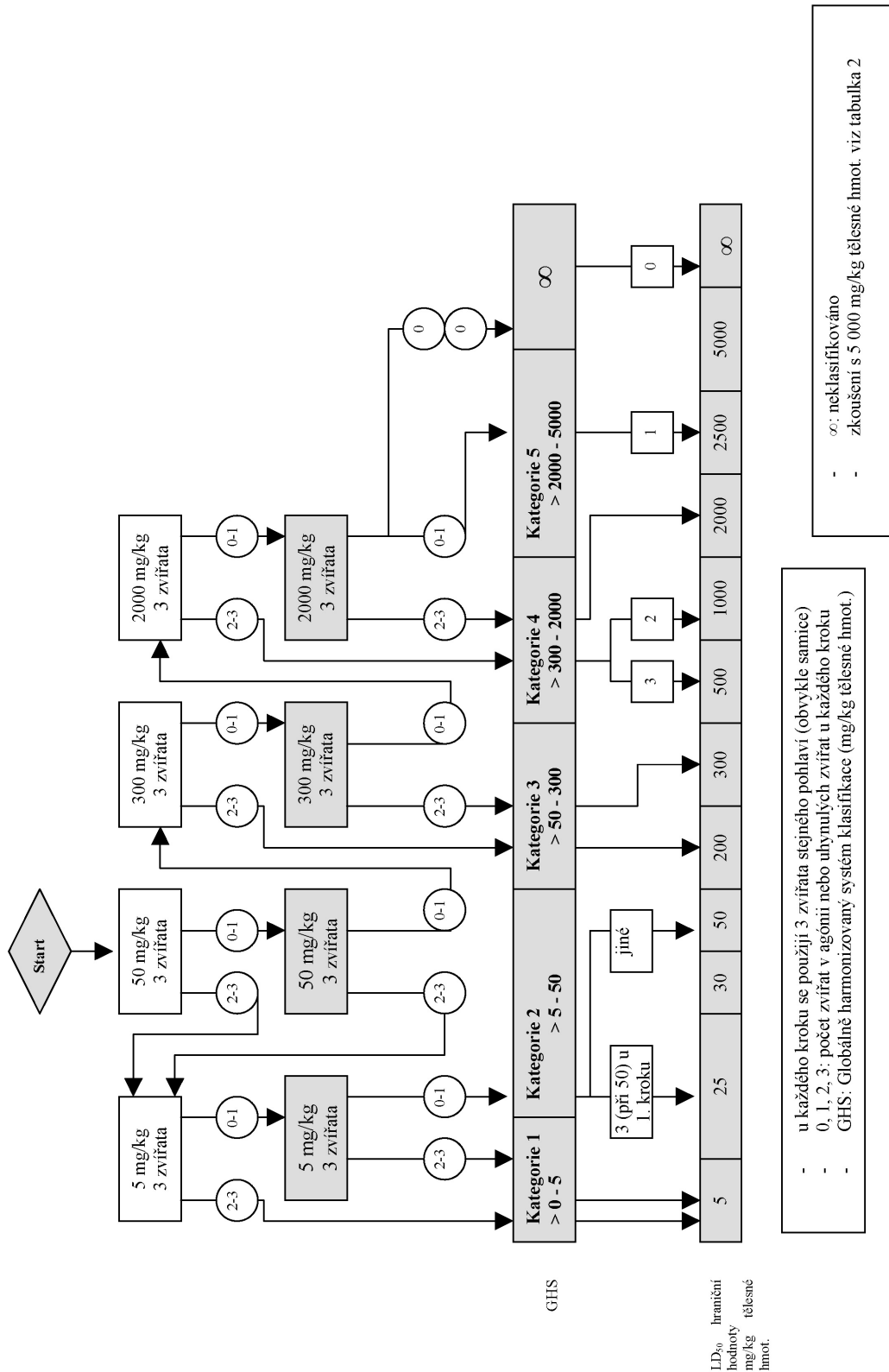
Tabulka 5a
POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 5 mg/kg TĚLESNÉ HMOTNOSTI



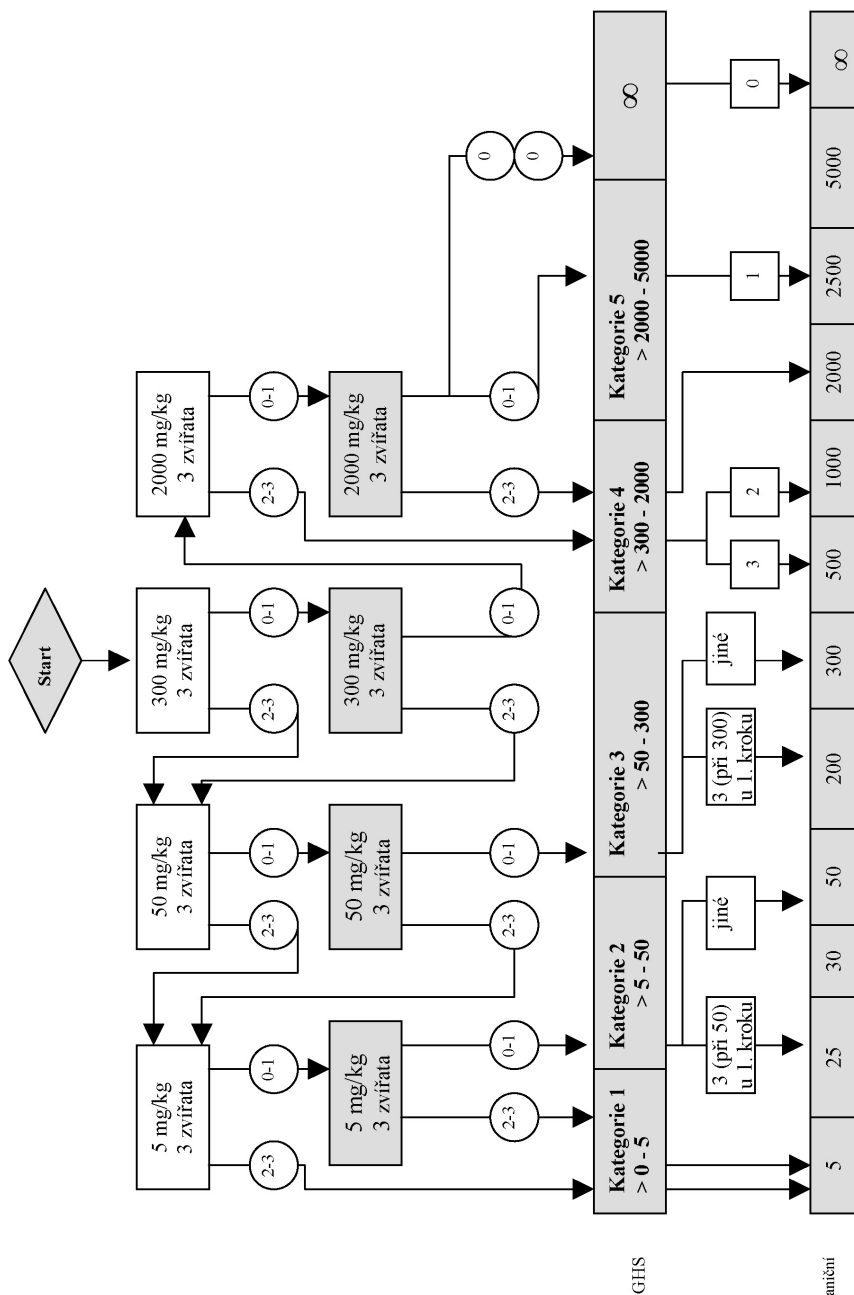
- u každého kroku se použijí 3 zvířata stejného pohlaví (obvykle samice)
- 0, 1, 2, 3: počet zvířat v agonii nebo ulynulých zvířat u každého kroku
- GHIS: Globálně harmonizovaný systém klasifikace (mg/kg tělesné hmot.)

- ∞: neklasifikováno
- - zkoušení s 5 000 mg/kg tělesné hmot. viz tabulka 2

Tabulka 5b
POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 50 mg/kg TĚLESNÉ HMOTNOSTI



TABULKA 5c
POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 300 mg/kg TĚLESNÉ HMOTNOSTI



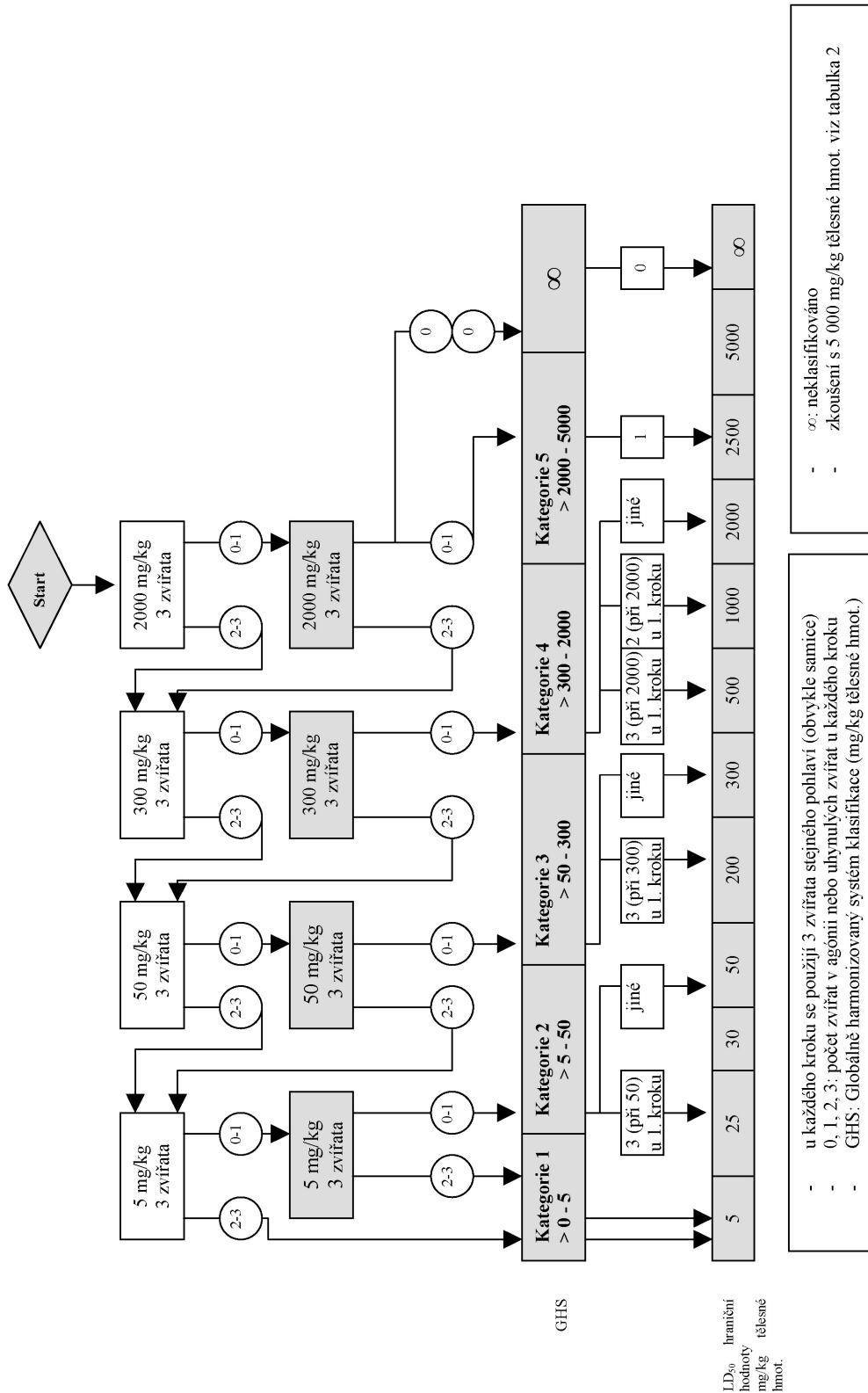
GHS

LD₅₀ hraníční hodnoty (mg/kg tělesné hmot.)

- u každého kroku se použijí 3 zvířata stejného pohlaví (obvykle samice)
- 0, 1, 2, 3: počet zvířat v agonii nebo utulných u každého kroku
- GHS: Globálně harmonizovaný systém klasifikace (mg/kg tělesné hmot.)

- ∞: neklasifikováno
- - : zkoušení s 5 000 mg/kg tělesné hmot. viz tabulka 2

TABULKA 5d
POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 2000 mg/kg TĚLESNÉ HMOTNOSTI



LD₅₀
 hodnoty
 mg/kg tělesné
 hmot.

GHS

Tabulka 6**KRITÉRIA KLASIFIKACE ZKOUŠENÝCH LÁTEK S OČEKÁVANÝMI HODNOTAMI LD₅₀ PŘESAHUJÍCÍMI 2 000 mg/kg BEZ NUTNOSTI ZKOUŠENÍ**

Kritéria pro kategorii nebezpečnosti 5 mají umožnit identifikaci zkoušených látek, u nichž je nebezpečí akutní toxicity relativně nízké, avšak které mohou za určitých okolností pro citlivé jedince představovat nebezpečí. U těchto látek se předpokládá, že se jejich orální nebo dermální LD₅₀ nebo LD₅₀ ekvivalentních dávek podávaných jinými cestami pohybuje v rozmezí od 2 000 do 5 000 mg/kg. Zkoušenou látku lze klasifikovat v kategorii nebezpečnosti definované jako $2\,000\text{ mg/kg} < LD_{50} < 5\,000\text{ mg/kg}$ (v GHS kategorii 5) v těchto případech:

- a) pokud je do této kategorie zařazena podle některého ze systémů zkoušení uvedeného v tabulce 5a – 5d, v závislosti na výskytech uhynutí,
- b) pokud jsou již k dispozici spolehlivé důkazy naznačující, že LD₅₀ se pohybuje v rozmezí hodnot kategorie 5, nebo pokud z jiných studií na pokusných zvířatech nebo toxických účinků na člověka vyplývají akutní obavy o lidské zdraví,
- c) pokud extrapolací, odhadem nebo měřením údajů není přiřazení do vyšší třídy nebezpečnosti odůvodněno a
 - pokud jsou k dispozici spolehlivé informace naznačující významné toxické účinky na člověka, nebo
 - pokud je během zkoušení orální cestou do hodnot kategorie 4 pozorováno uhynutí, nebo
 - v případech, kdy odborný posudek potvrdí závažné klinické příznaky toxicity při testování do hodnot kategorie 4 s výjimkou průjmu, piloerekce nebo rozcuchané srsti, nebo
 - v případech, kdy odborný posudek potvrdí spolehlivé informace, které naznačují potenciál pro významné akutní účinky vyplývající z jiných studií na pokusných zvířatech.

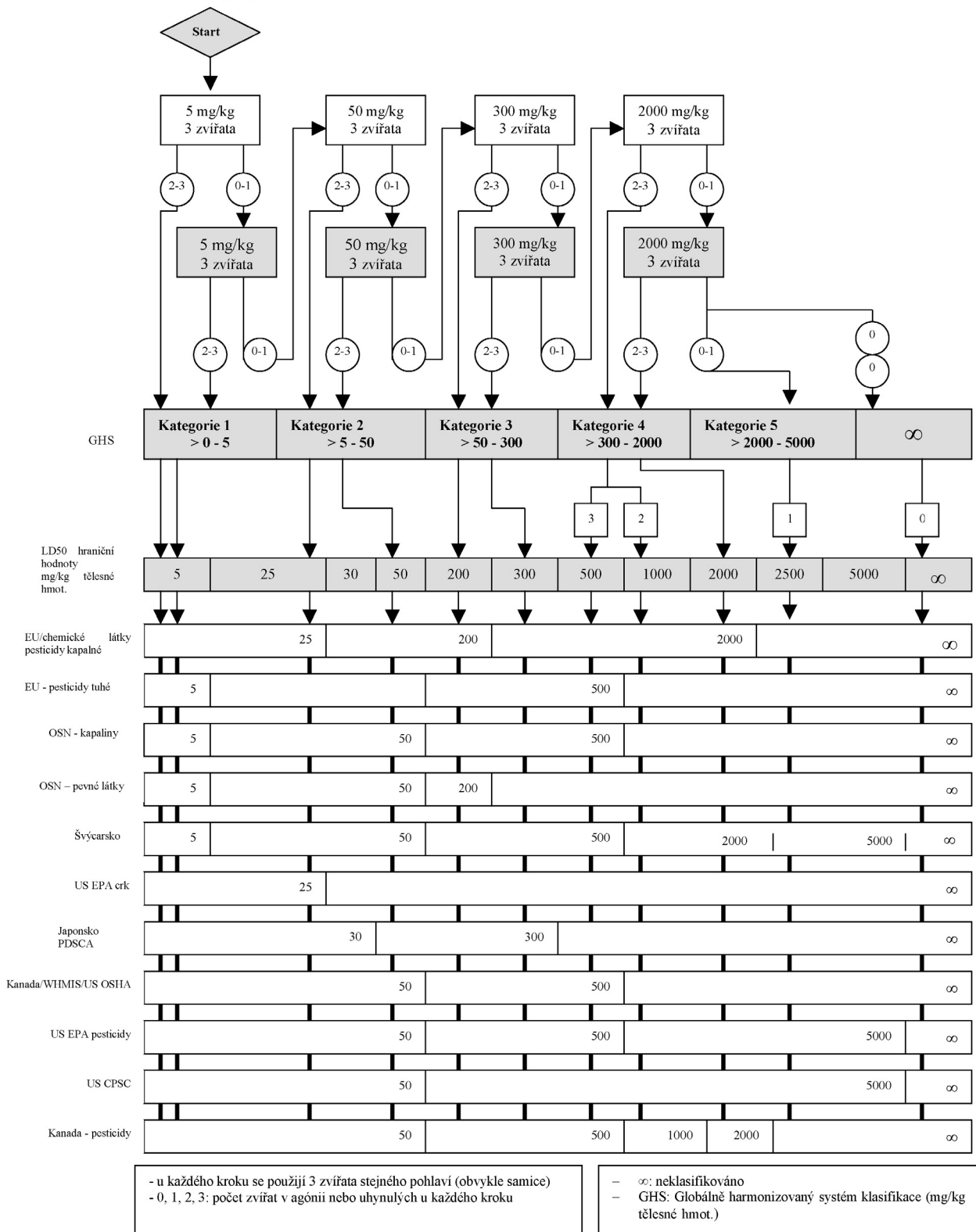
ZKOUŠENÍ V DÁVKÁCH PŘESAHUJÍCÍCH 2 000 mg/kg

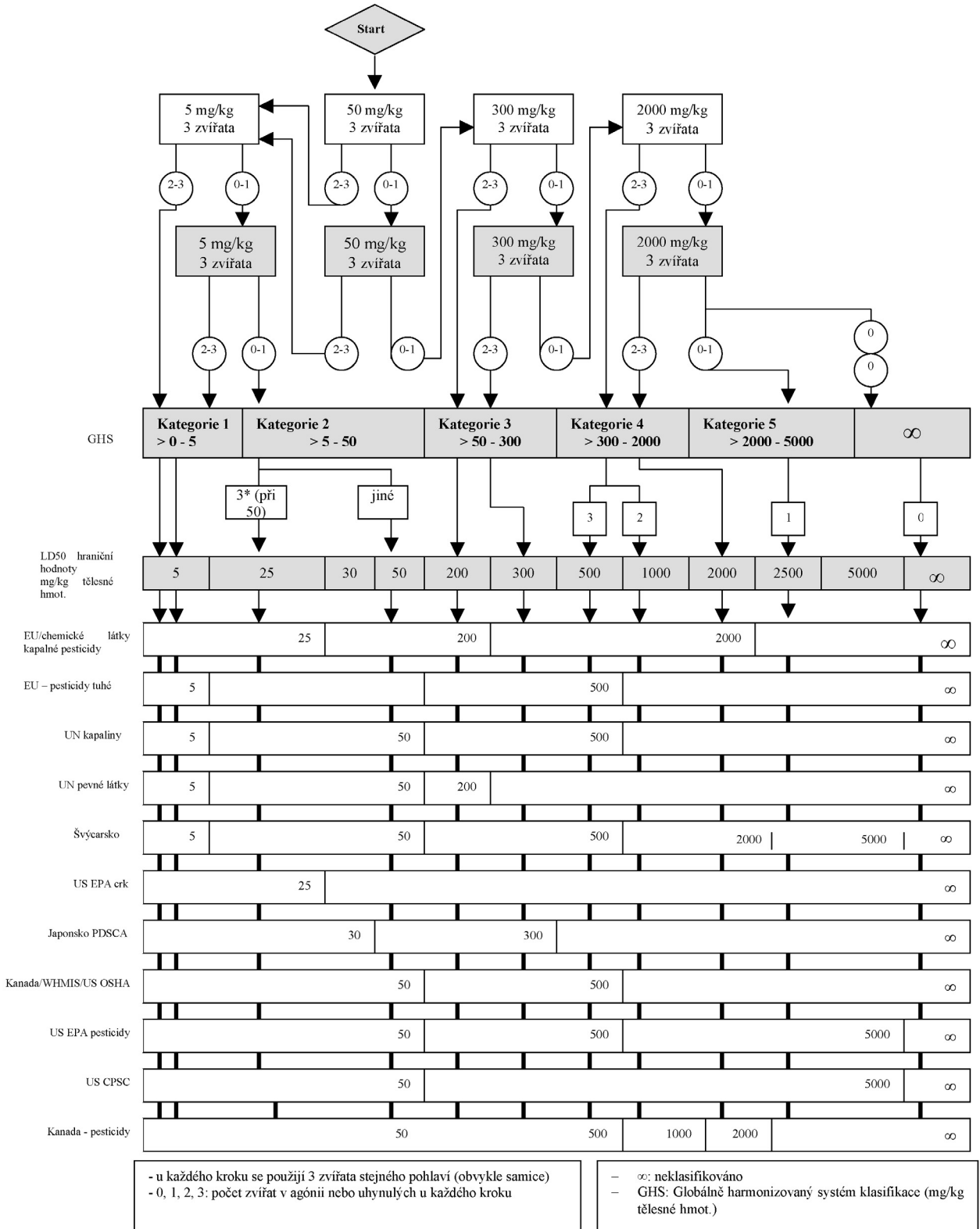
S ohledem na potřebu ochrany dobrého zacházení s pokusnými zvířaty se zkoušení na pokusných zvířatech v kategorii 5 (5 000 mg/kg) nedoporučuje a mělo by se zvažovat pouze v případě, že existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky mají přímý význam pro ochranu lidského zdraví nebo zdraví pokusných zvířat^{7a)}. S vyššími úrovněmi dávek se žádné další zkoušky neprovedou.

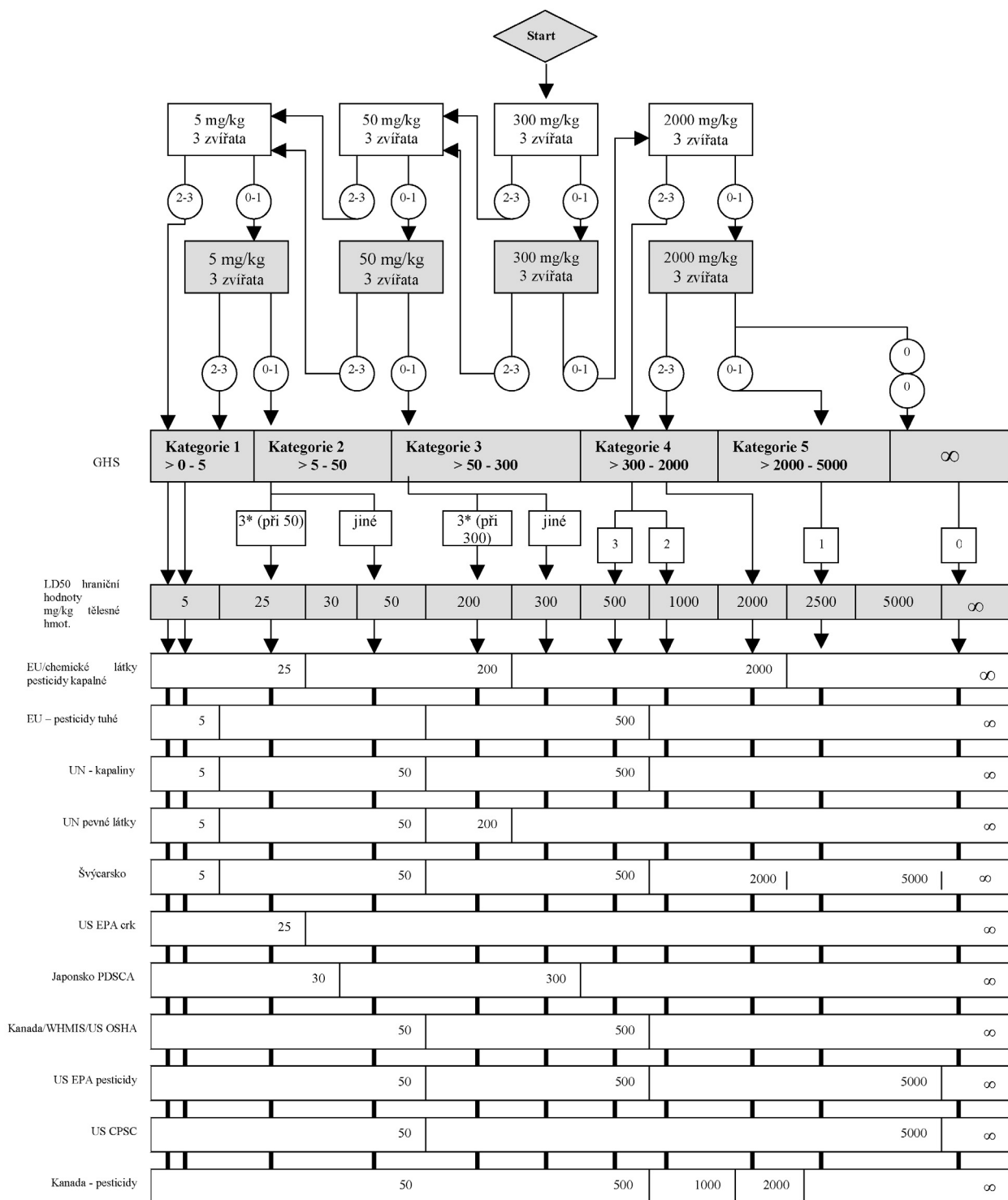
Pokud je vyžadováno zkoušení s dávkou 5 000 mg/kg, vyžaduje se pouze jeden krok (tj. tři pokusná zvířata). Pokud pokusné zvíře, jemuž byla podána dávka jako prvnímu,

uhyne, pokračuje podávání s úrovní 2 000 mg/kg podle vývojového diagramu v tabulce 5. Pokud první pokusné zvíře přežije, podá se dávka dalším dvěma pokusným zvířatům. Pokud uhynie pouze jedno pokusné zvíře ze tří pokusných zvířat, očekává se, že hodnota LD₅₀ přesáhne 5 000 mg/kg. Pokud uhynou obě pokusná zvířata, pokračuje se podáním dávky 2 000 mg/kg.

Tabulka 7
METODA ZKOUŠENÍ B.1 tris: Pokyny ke klasifikaci podle systému EU pro přechodné období do plného zavedení globálně harmonizovaného systému klasifikace (GHS) (převzato z literatury^{7a)})

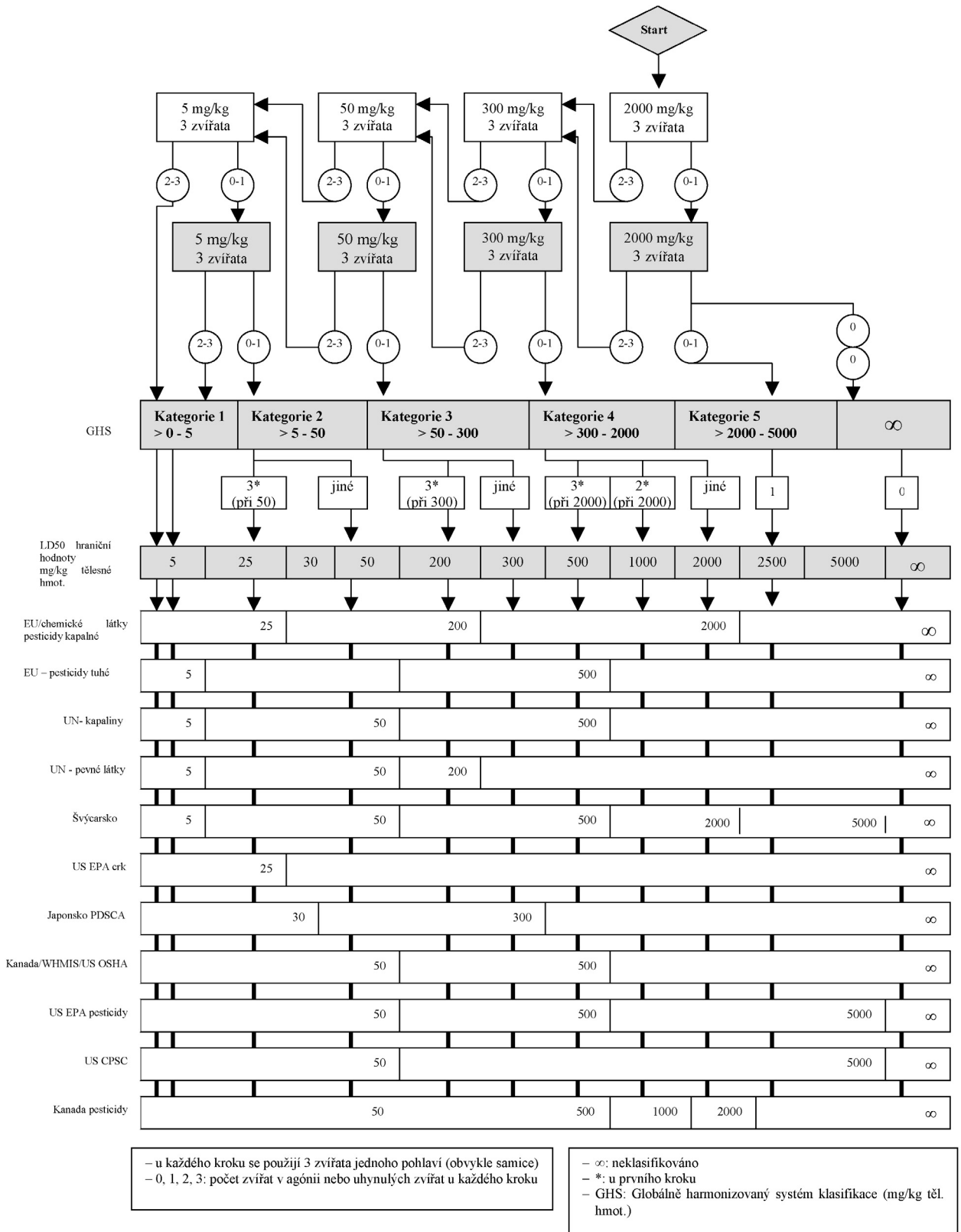






METODA ZKOUŠEN

- u každého kroku se použijí 3 zvířata jednoho pohlaví (obvykle samice)
- 0, 1, 2, 3: počet zvířat v agonii nebo uhynulých zvířat u každého kroku
- ∞: neklasifikováno
- *: u prvního kroku
- GHS: Globálně harmonizovaný systém klasifikace (mg/kg těl. hmot.)



7. V příloze č. 2 metoda B.4 KOŽNÍ DRÁŽDI-VOST zní:

„B.4 AKUTNÍ TOXICITA: DRÁŽDIVÉ A LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI

1 METODA je v souladu s právem Evropských společenství^{7a)}.

1.1 ÚVOD

Při přípravě této aktualizované metody byla zvláštní pozornost věnována možným zlepšením v oblasti dobrého zacházení s pokusnými zvířaty a hodnocení veškerých existujících informací o zkoušené látce s cílem vyhnout se nadbytečným zkouškám na pokusných zvířatech. Součástí této metody je doporučení, aby před provedením popsané zkoušky dráždivých a leptavých účinků látky na kůži *in vivo* byla vypracována analýza průkaznosti stávajících relevantních údajů. Pokud jsou k dispozici nedostatečné údaje, lze je rozpracovat využitím metody postupného zkoušení^{7a)}. Strategie zkoušení zahrnuje provedení validovaných a uznaných zkoušek *in vitro* a je popsána v tabulce 8 k této metodě. Navíc se v případě potřeby v počáteční zkoušce *in vivo* doporučuje namísto současného aplikování postupná aplikace tří testovacích náplastí.

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení s pokusnými zvířaty by se zkoušky *in vivo* neměly provádět, dokud nebyly všechny dostupné údaje významné pro potenciální leptavé nebo dráždivé účinky látky vyhodnoceny na základě analýzy průkaznosti výsledků. Takové údaje budou zahrnovat důkazy ze stávajících studií na lidech nebo pokusných zvířatech, důkazy leptavých nebo dráždivých účinků jedné nebo více strukturně příbuzných látek nebo směsí takových látek, údaje dokládající silnou kyselost nebo zásaditost látky^{7a)} a výsledky validovaných a uznaných zkoušek *in vitro* nebo *ex vivo*^{7a)}. Tato analýza by měla snížit potřebu zkoušek leptavých nebo dráždivých účinků na kůži metodou *in vivo* u látek, u nichž již existují důkazy z jiných studiích, pokud jde o tyto dva ukazatele.

V tabulce 8 k této metodě je uvedena upřednostňovaná strategie postupného zkoušení, jejíž součástí je provedení validovaných a uznaných zkoušek leptavých/dráždivých účinků *in vitro* nebo *ex vivo*. Tato strategie byla vypracována na semináři OECD^{7a)}, jeho účastníky jednohlasně doporučena a přijata jako doporučená strategie zkoušení v globálně harmonizovaném systému klasifikace chemických látek (GHS)^{7a)}. Doporučuje se, aby se podle této strategie zkoušení postupovalo před prováděním zkoušek *in vivo*. U nových látek se doporučuje metoda zkoušení po krocích, díky níž lze dosáhnout vědecky spolehlivých údajů o leptavých/dráždivých účincích látky. U existujících látek, o jejichž leptavých/dráždivých účincích na kůži není k dispozici dostatek údajů, by se měla tato strategie využít pro doplnění chybějících informací. Použití jiné strategie nebo postupu zkoušení nebo rozhodnutí nepoužít metodu po krocích musí být odůvodněno.

Pokud pomocí analýzy průkaznosti výsledků nelze o leptavých nebo dráždivých účincích rozhodnout, měla by se v souladu se strategií postupného zkoušení uvážit zkouška *in vivo* (viz tabulka 8).

1.2 DEFINICE

Dráždivé účinky na kůži: vyvolání vratných změn na kůži do 4 h po aplikaci zkoušené látky.

Leptavé účinky na kůži: vyvolání nevratného poškození kůže, zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky, do čtyř hodin po aplikaci zkoušené látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Látka, která má být zkoušena, se v jedné dávce nanese na kůži pokusného zvířete, přičemž oblasti neexponované kůže pokusného zvířete slouží jako kontrola. Ve stanovených intervalech se určí, vyhodnotí a následně popíše stupeň dráždivých/leptavých účinků, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné zhodnotit vratnost nebo nevratnost pozorovaných účinků.

Pokusná zvířata, která v jakékoli fázi zkoušky vykazují přetrvávající příznaky značného utrpení nebo bolesti, se humánně utratí a látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Kritéria rozhodování o utrácení umírajících a závažně trpících pokusných zvířat lze nalézt v literatuře^{7a)}.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Příprava na zkoušku *in vivo*

1.4.1.1 *Výběr druhu pokusných zvířat*

Upřednostňovaným pokusným zvířetem je albín králíka a používají se mladá dospělá pokusná zvířata. Při použití jiného druhu by se mělo podat zdůvodnění.

1.4.1.2 *Příprava pokusných zvířat*

Pokusná zvířata jsou vybrána s ohledem na druh, pohlaví a stáří v souladu s ustanovením § 15 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾ a označena tak, aby byla možná identifikace jednotlivých pokusných zvířat. Doba navykání stanoví § 10 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾.

Asi 24 h před zahájením zkoušky se pokusným zvířatům ostříhá srst na zádech. Je třeba dbát na to, aby se kůže neporanila. Smějí se použít pouze pokusná zvířata se zdravou, neporaněnou kůží.

Některé kmeny králíka mají plošky husté srsti, které jsou v některých obdobích roku výraznější. Na takových oblastech husté srsti by se zkouška provádět neměla.

1.4.1.3 *Podmínky chovu a krmení*

Pokusná zvířata by měla být chována samostatně. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla u králíků být $(20 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Ačkoliv by relativní vlhkost měla činit minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50 – 60 %. Osvětlení by mělo být umělé, mělo by se střídát 12 h světla a 12 h tmy, není-li v chovné místnosti denní světlo. Ke krmení lze použít obvyklé krmivo určené pro pokusná zvířata od registrovaného výrobce s neomezenou dodávkou pitné vody. Pokusná zvířata mohou být chována v klecích ve skupinách v souladu s příslušným právním předpisem¹⁰⁾, pokud není stanoveno projektem pokusů jinak, ale počet pokusných zvířat v kleci nesmí bránit nerušenému pozorování každého pokusného zvířete.

1.4.2 **Postup zkoušky**

1.4.2.1 *Aplikace zkoušené látky*

Zkoušená látka se nanese na malou plochu kůže (asi 6 cm^2) a pokryje se plátkem mulu s nedráždivou náplastí. V případech, kdy přímá aplikace není možná (např. kapaliny nebo některé pasty), by se měla zkoušená látka nejprve nanést na plátek mulu, který se následně přiloží na kůži. Po dobu trvání expozice je třeba přidržovat plátek volně na kůži vhodným semiokluzivním obvazem. Pokud se zkoušená látka nanáší na mul, měl by být na kůži připevněn tak, aby se zajistil dobrý styk s kůží a rovnoměrné rozložení látky na kůži. Je třeba zabránit tomu, aby se pokusné zvíře dostalo k mulu a zkoušenou látku požilo nebo vdechlo.

Kapalné zkoušené látky se zpravidla aplikují neředěné. Při zkouškách pevných látek (které mohou být podle potřeby rozetřeny na prach) se zkoušená látka navlhčí nejmenším množstvím vody (nebo podle potřeby jiným vhodným vehikulem) dostatečným k zajištění dobrého styku s kůží. Pokud se používají jiná vehikula než voda, měl by být potenciální vliv vehikula na dráždivé účinky zkoušené látky na kůži pouze minimální.

Po uplynutí doby expozice, která je obvykle 4 h, se odstraní zbytky zkoušené látky, pokud možno vodou nebo vhodným rozpouštědlem, aniž by došlo k ovlivnění odezvy nebo celistvosti kůže.

1.4.2.2 *Úroveň dávek*

Na testovací místo se nanese 0,5 ml kapaliny nebo 0,5 g tuhé látky nebo pasty.

1.4.2.3 *Počáteční zkouška (zkouška dráždivých/leptavých účinků na kůži in vivo s použitím jednoho pokusného zvířete)*

Důrazně se doporučuje, aby byla zkouška *in vivo* provedena nejprve na jednom pokusném zvířeti, zejména pokud existuje podezření, že látka má potenciální leptavé účinky. Tento postup je v souladu se strategií postupného zkoušení (viz tabulka 8).

Pokud byla na základě analýzy průkaznosti výsledků látka posouzena jako žiravá, není žádné další zkoušení na pokusných zvířatech nutné. U většiny látek, u nichž je podezření, že jsou žiravé, nejsou obvykle další zkoušky *in vivo* nezbytné. Avšak v těch případech, kde je kvůli nedostatku důkazů považováno za nezbytné zjistit další údaje, mohou být v omezené míře provedeny zkoušky na pokusných zvířatech podle tohoto postupu: pokusnému zvířeti se postupně přiloží nejvýše tři testovací náplasti. První náplast se odstraní po třech minutách. Pokud není pozorována závažná kožní reakce, odstraní se druhá náplast po jedné hodině. Pokud pozorování v této fázi naznačují, že expozici lze bez porušení zásady humánního zacházení prodloužit na čtyři hodiny, přiloží se třetí náplast, která se po čtyřech hodinách odstraní, a vyhodnotí se odezva.

Pokud je po některé ze tří následných expozic pozorován leptavý účinek, zkouška se okamžitě ukončí. Pokud po odstranění třetí náplasti není leptavý účinek pozorován, pokusné zvíře se pozoruje podobu 14 dnů, pokud se u něj poleptání kůže neprojeví dříve.

V takových případech, kdy se u zkoušené látky nepředpokládá, že vyvolá leptavé účinky, ale může být dráždivá, by se měla jednomu pokusnému zvířeti přiložit jedna náplast na čtyři hodiny.

1.4.2.4 *Potvrzující zkouška (zkouška dráždivých účinků na kůži in vivo s dalšími pokusnými zvířaty)*

Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit na dvou dalších pokusných zvířatech, u každého s jednou náplastí s dobou expozice 4 h. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován dráždivý účinek, lze potvrzující zkoušku provést postupně, nebo exponováním dvou dalších pokusných zvířat současně. Ve výjimečném případě, kdy se počáteční zkouška neprovádí, lze dvěma nebo třem pokusným zvířatům přiložit jednu náplast, která se po čtyřech hodinách odstraní. Jestliže se použijí dvě pokusná zvířata a u obou se projeví stejná reakce, není žádné další zkoušení nutné. Jinak se zkouší také třetí pokusné zvíře. Sporné reakce může být nutné zhodnotit na dalších pokusných zvířatech.

1.4.2.5 *Doba pozorování*

Doba pozorování by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné plně zhodnotit vratnost pozorovaných účinků. Zkouška by však měla být ukončena kdykoliv v okamžiku, kdy pokusné zvíře vykazuje přetrvávající příznaky značné bolesti nebo utrpení. Za účelem určení vratnosti účinků

by se pokusná zvířata měla pozorovat 14 dnů po odstranění náplastí. Pokud je vratnost pozorována před uplynutím 14 dnů, zkouška by se měla v tomto okamžiku ukončit.

1.4.2.6 *Klinická pozorování a hodnocení reakcí kůže*

Všechna pokusná zvířata se pozorují na příznaky erytému a edému a reakce kůže se hodnotí po 60 min a dále po 24, 48 a 72 h po odstranění náplastí se zkoušenou látkou. V počáteční zkoušce na jednom pokusném zvířeti se po odstranění náplastí okamžitě vyšetří také testovací místo. Kožní reakce se vyhodnotí a zaznamenají podle stupnice v níže uvedené tabulce 9. Pokud se objeví poškození kůže, které po 72 h nelze označit za dráždivé nebo leptavé účinky, může být nezbytné pozorování až do 14. dne kvůli stanovení vratnosti účinků. Vedle pozorování dráždivých účinků by měly být důkladně popsány a zaznamenány veškeré místní toxické účinky, jako je odtučnění kůže a jakékoli systémové nežádoucí účinky (např. vliv na klinické příznaky toxicity a tělesnou hmotnost). Pro objasnění sporných reakcí by se mělo uvážit histopatologické vyšetření.

Hodnocení reakcí kůže je nevyhnutelně subjektivní. S cílem podporovat harmonizaci hodnocení reakcí kůže a napomáhat zkušebními laboratořím a těm, kdo provádějí a interpretují pozorování, musí být zaměstnanci provádějící pozorování odpovídajícím způsobem kvalifikováni pro práci s používaným systémem vyhodnocování (viz níže uvedená tabulka 9). Jako pomůcku lze použít ilustrované pokyny pro hodnocení dráždivých účinků na kůži a jiných lézí^{7a)}.

2 **DATA**

2.1 **PŘEDKLÁDÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Výsledky studie se shrnou do tabulky uvedené v závěrečném protokolu o zkoušce. Měly by zpracovávat všechny položky uvedené v části 3.1.

2.2 **HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ**

Stupně dráždivých účinků na kůži se zhodnotí ve spojení s povahou a stupněm závažnosti lézí a jejich vratností nebo nevratností. Jednotlivé stupně nepředstavují absolutní měřítko dráždivých vlastností látky, neboť se hodnotí také jiné účinky zkoušené látky. Jednotlivé stupně by spíše měly být považovány za referenční hodnoty, které je nutno zhodnotit společně s dalšími pozorováními vyplývajícími ze studie.

Při hodnocení dráždivých reakcí se zohlední vratnost kožních lézí. Pokud do ukončení čtrnáctidenní doby pozorování přetrvávají reakce jako alopecie (na omezené ploše), hyperkeratóza, hyperplazie a šupinatění, považuje se zkoušená látka za dráždivou.

3 **PROJEKT POKUSU, PROTOKOL POKUSU A ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA**

V souladu s příslušnými právními předpisy^{9),10)} musí být zpracován projekt pokusu a o průběhu pokusu je nutno vést protokol.

3.1 Zpráva o průběhu pokusu obsahuje tyto informace:

Zdůvodnění zkoušení *in vivo*: analýza průkaznosti výsledků předchozích pokusů, včetně výsledků strategie postupného zkoušení:

- popis relevantních údajů z předchozích zkoušek,
- údaje získané v každé fázi strategie zkoušení,
- popis provedených zkoušek *in vitro*, včetně podrobných údajů o postupech a o výsledcích získaných se zkoušenými/referenčními látkami,
- analýza průkaznosti výsledků odůvodňující provedení studie *in vivo*.

Zkoušená látka:

- identifikační údaje (např. číslo CAS, zdroj, čistota, známé nečistoty, šarže),
- fyzikální povaha a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. pH, těkavost, rozpustnost, stabilita),
- pokud jde o směs, její složení a relativní podíl složek vyjádřený v procentech.

Vehikulum:

- identifikace, koncentrace (podle potřeby), použitý objem,
- zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen, zdůvodnění použití jiných pokusných zvířat, není-li použit albín králíka,
- počet pokusných zvířat každého pohlaví,
- hmotnosti jednotlivých pokusných zvířat na začátku a v závěru zkoušky,
- stáří na začátku studie,
- původ pokusných zvířat, podmínky chovu, krmivo atd.

Zkušební podmínky:

- technika přípravy oblasti kůže, na níž se nanese náplast,
- podrobné údaje o materiálech použitých na náplasti a technice aplikování náplastí,
- podrobné údaje o přípravě zkoušené látky, jejím nanesení a odstranění.

Výsledky:

- údaje o stupni odezvy na dráždivé nebo leptavé účinky u každého pokusného zvířete ve všech okamžicích měření,
- popis všech pozorovaných lézí,
- podrobný popis povahy a stupně pozorovaných dráždivých nebo leptavých účinků a případné histopatologické nálezy,
- popis jiných místních (např. odtučnění kůže) a systémových účinků vedle dráždivých nebo leptavých účinků na kůži.

Diskuse a interpretace výsledků.

Závěry.

TABULKA 9: HODNOCENÍ KOŽNÍCH REAKCÍ**Tvorba erytému a příškvaru**

Žádný erytém	0
Velmi slabý erytém (sotva patrný)	1
Zřetelně viditelný erytém	2
Mírný až výrazný erytém	3
Těžký erytém (silné zrudnutí) nebo tvorba příškvaru znemožňující posouzení erytému	4

Maximálně možné: 4

Tvorba edému

Žádný edém	0
Velmi lehký edém (sotva patrný)	1
Lehký edém (okraje jsou patrné, plocha je ohraničena zřetelným vyvýšením)	2
Mírný edém (okraje vyvýšeny asi o 1 mm)	3
Výrazný edém (zduření více než 1 mm a otok přesahující hranice exponované plochy)	4

Maximálně možné: 4

Pro objasnění sporných reakcí lze provést histopatologické vyšetření.

Tabulka 8

Strategie postupného zkoušení dráždivých a leptavých účinků na kůži

OBECNÉ ÚVAHY

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení s pokusnými zvířaty je důležité vyhnout se zbytečnému používání pokusných zvířat a minimalizovat jakékoli zkoušky, které u pokusných zvířat pravděpodobně vyvolají závažné reakce. Veškeré informace týkající se potenciálních leptavých/dráždivých účinků látky na kůži by se měly zhodnotit před zvažováním zkoušení *in vivo*. Může již existovat dostatek důkazů pro klasifikaci zkoušené látky podle jejího potenciálu vyvolávat leptavé nebo dráždivé účinky na kůži, aniž by bylo nutné provádět zkoušky na pokusných zvířatech. Proto využití analýzy průkaznosti výsledků a strategie postupného zkoušení sníží potřebu provádět zkoušení *in vivo*, zejména pokud látka pravděpodobně vyvolá závažné reakce.

Doporučuje se, aby se stávající informace týkající se dráždivých nebo leptavých účinků látky na kůži zhodnotily pomocí analýzy průkaznosti výsledků, na jejímž základě se rozhodne o tom, zda by se k lepší charakteristice tohoto potenciálu měly provést další studie jiné než kožní studie *in vivo*. Jsou-li nutné další studie, doporučuje se využít strategie postupného zkoušení a její pomocí získat relevantní experimentální údaje. U látek, které doposud nebyly zkoušeny, by měla být strategie postupného zkoušení využita k získání souboru údajů, které jsou nezbytné k vyhodnocení jejich potenciálních leptavých nebo dráždivých účinků. Strategie zkoušení popsaná v této tabulce 8 byla vypracována na semináři OECD^{7a)} a později potvrzena a rozpracována v Harmonizovaném integrovaném systému klasifikace nebezpečí chemických látek pro lidské zdraví a jejich vlivu na životní prostředí, který schválilo 28. společné zasedání Výboru pro chemické látky a Pracovní skupiny pro chemické látky v listopadu 1998^{7a)}.

Ačkoliv tato strategie postupného zkoušení není nedílnou součástí zkušební metody B.4, vyjadřuje doporučený postup stanovení dráždivých/leptavých účinků na kůži. Tento postup představuje nejlepší praktický i etický standard pro zkoušení dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*. Metoda zkoušení poskytuje pokyny pro provádění zkoušky *in vivo* a shrnuje faktory, které by před zahájením takové zkoušky měly být zváženy. Tato strategie představuje přístup posuzování existujících údajů o dráždivých/leptavých účincích zkoušených látek a odstupňovaný přístup k vytváření relevantních údajů o látkách, u kterých je nutné provést další studie, nebo u nichž žádné studie nebyly doposud provedeny. Doporučuje se také za určitých okolností provést validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* na zjištění dráždivých/leptavých účinků na kůži.

POPIS STRATEGIE VYHODNOCOVÁNÍ A ZKOUŠENÍ

Před zahájením zkoušek v rámci strategie postupného zkoušení (tabulka 8 pokračování) se vyhodnotí veškeré dostupné informace, aby se mohlo rozhodnout o nutnosti provést zkoušení *in vivo*. Ačkoliv lze významné informace získat z vyhodnocení jednotlivých parametrů (např. extrémní hodnota pH), stávající informace by se měly vzít v úvahu jako celek. Všechny relevantní údaje o účincích dotyčné látky nebo jejich obdob se vyhodnotí na základě rozhodnutí založeném na

průkaznosti výsledků. Mělo by se podat zdůvodnění tohoto rozhodnutí. Hlavní důraz by se měl klást na již existující údaje o účincích látky na člověka a zvířata a dále na výsledky zkoušení *in vitro* nebo *ex vivo*. Studie žíravých látek *in vivo* by se měly provádět co nejméně. Mezi faktory uvedené ve strategii zkoušení patří:

Hodnocení existujících údajů o účincích látky na člověka a zvířata (krok 1). Nejprve je nutné vzít v úvahu existující údaje o účincích na člověka, např. klinické studie nebo studie nemocí z povolání, záznamy subjektů hodnocení nebo údaje o zkouškách na pokusných zvířatech, např. z jednorázových nebo opakovaných studií dermální toxicity, protože z těchto údajů lze získat informace přímo se vztahující k účinkům na kůži. Látky, jejichž dráždivé nebo leptavé účinky jsou známy, a látky, o nichž existují jednoznačné důkazy, že leptavé nebo dráždivé účinky nemají, není nutné zkoušet ve studiích *in vivo*.

Analýza vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR) (krok 2). Vezmou se v úvahu výsledky zkoušek strukturně příbuzných látek, jsou-li k dispozici. Pokud jsou k dispozici dostatečné údaje o účincích strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí na člověka nebo pokusná zvířata naznačující, že mají potenciál leptavých/dráždivých účinků, lze předpokládat, že hodnocená zkoušená látka vyvolá stejné reakce. V takových případech není nutné tuto látku zkoušet. Negativní údaje získané ze studií strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí nezakládají podle strategie postupného zkoušení dostatečný důkaz o neexistenci leptavých/dráždivých účinků látky. Ke stanovení potenciálních leptavých a dráždivých účinků na kůži by měly být použity validované a uznané postupy vycházející z analýzy SAR.

Fyzikálně-chemické vlastnosti a chemická reaktivita (krok 3). Látky vykazující extrémní hodnoty pH jako $\leq 2,0$ a $\geq 11,5$ mohou mít silné místní účinky. Pokud se leptavé účinky látky na kůži stanoví na základě extrémních hodnot pH, lze také vzít v úvahu kyselou/alkalickou rezervu (pufrační kapacitu)^{7a)}. Pokud lze podle puфраční kapacity soudit, že látka možná nemá leptavé účinky na kůži, musí tento předpoklad potvrdit další zkoušky, pokud možno s využitím validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* (viz kroky 5 a 6).

Dermální toxicita (krok 4). Pokud se ukáže, že chemická látka je při podání dermální cestou vysoce toxická, nemusí být studie dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*, neboť množství zkoušené látky, které se obvykle nanáší, by mohlo přesáhnout vysoce toxickou dávku a mít za následek uhynutí nebo závažné utrpení pokusných zvířat. Navíc pokud byly studie dermální toxicity využívající albíny králíka již provedeny do limitní úrovně dávky 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti nebo vyšší a nebyly zjištěny žádné dráždivé nebo leptavé účinky, nemusí být další zkoušky dráždivých/leptavých účinků na kůži nezbytné. Při hodnocení akutní dermální toxicity v předchozích studiích je nutné mít na paměti několik aspektů. Např. zaznamenané informace o dermálních lézích nemusí být úplné. Zkoušení a pozorování mohlo být prováděno na jiných druzích než králík a citlivost reakcí jednotlivých druhů se může do značné míry lišit. Také forma zkoušené látky, která byla pokusným zvířatům podávána, nemusela být vhodná pro hodnocení dráždivých/leptavých účinků na kůži (např. ředění látek určených ke zkoušení dermální toxicity)^{7a)}. Avšak v takových případech, kdy byly na králících provedeny dobře navržené a realizované studie dermální toxicity, lze negativní nálezy považovat za dostatečné důkazy, že látka není žíravá nebo dráždivá.

Výsledky ze zkoušek in vitro nebo ex vivo (kroky 5 a 6). Látky, které vykazovaly leptavé nebo výrazně dráždivé účinky ve validované a uznané zkoušce *in vitro* nebo *ex vivo*^{7a)}, jejímž cílem bylo hodnocení specifických účinků, není nutné zkoušet na pokusných zvířatech. Lze předpokládat, že takové látky vyvolají ve zkoušce *in vivo* podobné závažné účinky.

Zkouška in vivo na králících (kroky 7 a 8). Pokud je k provedení zkoušení *in vivo* nutné rozhodnutí založené na průkaznosti výsledku, mělo by toto zkoušení začínat s počáteční zkouškou na jednom pokusném zvířeti. Pokud výsledky této zkoušky naznačují, že látka má leptavé účinky na kůži, nemělo by se další zkoušení provádět. Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit maximálně na dvou dalších pokusných zvířatech po dobu expozice 4 h. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován dráždivý účinek, lze potvrzující zkoušku provést postupně, nebo exponováním dvou dalších pokusných zvířat současně.

Tabulka 8 pokračování

STRATEGIE ZKOUŠENÍ A HODNOCENÍ DRÁŽDIVÝCH/LEPTAVÝCH ÚČINKŮ NA KŮŽI

Aktivita	Nález	Závěr
1 Existující údaje o účincích látky na kůži nebo sliznice u člověka nebo u pokusných zvířat	Žíravá Dráždivá Nežíravá/nedráždivá	Dominantní ukazatel; považována za žíravou. Není nutné zkoušet. Dominantní ukazatel; považována za dráždivou. Není nutné zkoušet. Dominantní ukazatel; považována za nežíravou nebo nedráždivou. Není nutné zkoušet.
↓ <i>Nejsou k dispozici žádné informace, nebo informace nejsou přesvědčivé</i>		
2 Proveďte hodnocení leptavých/dráždivých účinků na kůži podle analýzy SAR	Předpoklad závažného poškození kůže Předpoklad dráždivých účinků na kůži	Považována za žíravou. Není nutné zkoušet. Považována za dráždivou. Není nutné zkoušet.
↓ <i>Nelze stanovit žádné předpoklady, nebo jsou předpoklady nepřesvědčivé nebo negativní</i>		
3 Změřte pH (s ohledem na pufrací kapacitu, pokud je významná)	$pH \leq 2$ nebo $\geq 11,5$ (s vysokou pufrací kapacitou, pokud je významná)	Předpokládané leptavé účinky. Není nutné zkoušet.
↓ $2 < pH < 11,5$, nebo $pH \leq 2,0$ nebo $\geq 11,5$ <i>s nízkou nebo žádnou pufrací kapacitou, pokud je to relevantní</i>		

- | | | | |
|---|---|---|---|
| 4 | Vyhodnořte údaje o systémové toxicitě dermální cestou ¹ | Vysoce toxická

Nežiravá nebo nedráždivá při zkouškách na králících do limitní dávky 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti nebo vyšší | Není třeba žádné další zkoušení.

Předpokládáný nežiravý nebo nedráždivý charakter látky. Není třeba žádné další zkoušení. |
| | ↓ | | |
| | <i>Takové informace nejsou k dispozici, nebo nejsou přesvědčivé</i> | | |
| | ↓ | | |
| 5 | Proveďte validovanou a uznanou zkoušku leptavých účinků na kůži <i>in vitro</i> nebo <i>ex vivo</i> | Leptavé účinky | Předpokládaná žravost <i>in vivo</i> . Není třeba žádné další zkoušení. |
| | ↓ | | |
| | <i>Látka není žravá</i> | | |
| | ↓ | | |
| 6 | Proveďte validovanou a uznanou zkoušku dráždivých účinků na kůži <i>in vitro</i> nebo <i>ex vivo</i> | Dráždivé účinky | Předpokládaná dráždivost <i>in vivo</i> . Není třeba žádné další zkoušení. |
| | ↓ | | |
| | <i>Validované metody zkoušení dráždivých účinků na kůži in vitro nebo ex vivo ještě nejsou k dispozici nebo látka není dráždivá</i> | | |
| | ↓ | | |
| 7 | Proveďte počáteční zkoušku na králících <i>in vivo</i> na jednom pokusném zvířeti | Závažné poškození kůže | Považována za žravou. Není třeba žádné další zkoušení. |
| | ↓ | | |
| | <i>Žádné závažné poškození</i> | | |
| | ↓ | | |
| 8 | Proveďte potvrzující zkoušku na jednom nebo dvou pokusných zvířatech | Žiravá nebo dráždivá

Nežiravá nebo nedráždivá | Považována za žravou nebo dráždivou. Není třeba žádné další zkoušení.

Považována za nežiravou nebo nedráždivou. Není třeba žádné další zkoušení. |

¹ Lze zvážit kroky 2 a 3.“

8. V příloze č. 2 metoda B.5 OČNÍ DRÁŽDI-VOST zní:

„B.5 AKUTNÍ TOXICITA: DRÁŽDIVÉ A LEPTAVÉ ÚČINKY NA OČI

1 METODA je v souladu s právem Evropských společenství^{7a)}.

1.1 ÚVOD

Při přípravě této aktualizované metody byla zvláštní pozornost věnována možným zlepšením, jichž lze dosáhnout vyhodnocováním veškerých existujících informací o zkoušené látce s cílem vyhnout se nadbytečným zkouškám na pokusných zvířatech a brát tak ohled na dobré zacházení s pokusnými zvířaty. Součástí této metody je doporučení, aby před provedením popsané zkoušky akutních dráždivých/leptavých účinků na oči *in vivo* byla vypracována analýza průkaznosti^{7a)} stávajících relevantních údajů. Pokud jsou k dispozici nedostatečné údaje, doporučuje se je získat pomocí metody postupného zkoušení^{7a)}. Strategie zkoušení zahrnuje provedení validovaných a schválených zkoušek *in vitro* a je popsána v tabulce 10 k této metodě zkoušení. Navíc se před zvažováním očního testu *in vivo* doporučuje provést zkoušku dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*, na jejímž základě se předpoví možné leptavé účinky na oči.

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a rovněž dobrého zacházení s pokusnými zvířaty by se ke zkouškám *in vivo* nemělo přistupovat, dokud nebyly všechny dostupné údaje významné pro potenciální leptavé/dráždivé účinky látky na oči vyhodnoceny na základě analýzy průkaznosti výsledků. Takové údaje budou zahrnovat důkazy ze stávajících studií na lidech nebo pokusných zvířatech, důkazy leptavých/dráždivých účinků jedné nebo více strukturně příbuzných látek nebo směsí těchto látek, údaje dokládající vysokou kyselost nebo zásaditost látky^{7a)} a výsledky validovaných a uznaných zkoušek leptavých a dráždivých účinků na kůži *in vitro* nebo *ex vivo*^{7a)}. Tyto studie mohly být vypracovány před analýzou průkaznosti výsledků nebo na základě zjištění této analýzy.

U některých látek může taková analýza naznačovat nutnost provedení studií potenciálních leptavých/dráždivých účinků látky na oči *in vivo*. Ve všech takových případech se před zvážením použití oční zkoušky *in vivo* nejprve provede studie účinků látky na kůži *in vivo* a zhodnotí se v souladu s metodou zkoušení B.4^{7a)}. Použití analýzy průkaznosti výsledků a strategie postupného zkoušení by mělo omezit potřebu zkoušení leptavých/dráždivých účinků na oči těch látek, u nichž tyto účinky byly již dostatečně doloženy v jiných studiích. Pokud pomocí strategie postupného zkoušení nelze o možnosti leptavých nebo dráždivých účinků na oči rozhodnout ani po provedení studie leptavých a dráždivých účinků na kůži *in vivo*, lze provést zkoušku leptavých/dráždivých účinků na oči *in vivo*.

Upřednostňovaná strategie postupného zkoušení, jejíž součástí je provedení validovaných zkoušek leptavých/dráždivých účinků *in vitro* nebo *ex vivo*, je uvedena v tabulce 10 k této metodě zkoušení. Tato strategie byla vypracována na semináři OECD^{7a)}, jeho účastníky jednohlasně doporučena a přijata jako doporučená strategie zkoušení v globálně harmonizovaném systému klasifikace chemických látek (GHS)^{7a)}. Doporučuje se, aby se podle této strategie zkoušení postupovalo před prováděním zkoušek *in vivo*. U nových látek se doporučuje metoda zkoušení po krocích, díky níž lze dosáhnout vědecky spolehlivých údajů o leptavých/dráždivých účincích látky. U existujících látek, o jejichž leptavých/dráždivých účincích na kůži a oči není k dispozici dostatek údajů, by se měla tato strategie využít pro doplnění chybějících informací. Použití jiné strategie nebo postupu zkoušení nebo rozhodnutí nepoužít metodu po krocích musí být odůvodněno.

1.2 DEFINICE

Dráždivé účinky na oči: vyvolání změn v oku po aplikaci zkoušené látky na přední povrch oka. Tyto změny jsou plně vratné do 21 dnů po aplikaci.

Leptavé účinky na oči: vyvolání poškození oční tkáně nebo závažné fyzické zhoršení vidění po aplikaci zkoušené látky na přední povrch oka. Toto poškození není plně vratné do 21 dnů po aplikaci.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Látka, která má být zkoušena, se nanese v jedné dávce na jedno oko pokusného zvířete, přičemž neexponované oko slouží jako kontrola. V určitých intervalech se na základě určení lézí spojivky, rohovky a duhovky vyhodnotí stupeň dráždivých/leptavých účinků na oči. Popíše se také jiné účinky na oko a nežádoucí systémové účinky, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné zhodnotit vratnost nebo nevratnost účinků.

Pokusná zvířata, která v jakékoli fázi zkoušky vykazují přetrvávající příznaky značného utrpení nebo bolesti, se humánně utratí a látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Kritéria rozhodování o utrácení umírajících a závažně trpících pokusných zvířat lze nalézt v literatuře^{7a)}.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Příprava na zkoušku *in vivo*

1.4.1.1 Výběr živočišných druhů

Upřednostňovaným pokusným zvířetem je albín králíka a používají se zdravá mladá dospělá pokusná zvířata. Při použití jiných kmenů nebo druhů by se mělo podat zdůvodnění.

1.4.1.2 *Příprava pokusných zvířat*

Pokusná zvířata jsou vybrána s ohledem na druh, pohlaví a stáří v souladu s ustanovením § 15 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾ a označena tak, aby byla možná identifikace jednotlivých pokusných zvířat. Dobu navykání stanoví § 10 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾. 24 h před zkouškou se u každého z předběžně vybraných pokusných zvířat provede vyšetření obou očí. Pokusná zvířata, u kterých se zjistí podráždění očí, oční defekt nebo poškození rohovky, se nepoužijí.

1.4.1.3 *Podmínky chovu a krmení*

Pokusná zvířata by měla být chována samostatně. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla u králíků činit (20 ± 3) °C. Ačkoliv by relativní vlhkost měla činit minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 % během úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50 – 60 %. Osvětlení by mělo být umělé, mělo by se střídat 12 h světla a 12 h tmy, není-li v chovné místnosti denní světlo. Ke krmení lze použít obvyklé krmivo určené pro pokusná zvířata od registrovaného výrobce s neomezenou dodávkou pitné vody. Pokusná zvířata mohou být chována v klecích ve skupinách v souladu s příslušným právním předpisem¹⁰⁾, pokud není stanoveno projektem pokusů jinak, ale počet pokusných zvířat v kleci nesmí bránit nerušenému pozorování každého pokusného zvířete.

1.4.2 **Postup zkoušky**

1.4.2.1 *Aplikace zkoušené látky*

Zkoušená látka se aplikuje každému pokusnému zvířeti do spojivkového vaku jednoho oka tak, že se spodní víčko lehce odchlípne od oční bulvy. Víčka se pak asi na jednu sekundu lehce přidrží u sebe, aby nedošlo ke ztrátě látky. Druhé oko, do kterého se látka neaplikuje, slouží jako kontrola.

1.4.2.2 *Výplach*

Oči pokusných zvířat se do 24 h po instilaci zkoušené látky nevyplachují, s výjimkou pevných látek (viz část 1.4.2.3.2) a v případě okamžitých leptavých nebo dráždivých účinků. Použití satelitní skupiny pokusných zvířat k vyšetření vlivu výplachu očí se nedoporučuje, pokud to není vědecky odůvodněno. Je-li satelitní skupina nezbytná, použijí se dva králíci. Podmínky výplachu se podrobně zdokumentují, např. doba výplachu, složení a teplota promývacího roztoku, trvání, objem a rychlost aplikace.

1.4.2.3 *Úroveň dávek*

1.4.2.3.1 *Zkoušení kapalin*

Při zkoušení kapalin se použije dávka 0,1 ml. K instilaci látky přímo do oka by se neměly používat aerosolové rozstřikovače s čerpadlem. Před

instilací 0,1 ml do oka by se měla tekutina z rozstřikovače vypudit a shromáždit do nádobky.

1.4.2.3.2 *Zkoušení pevných látek*

Při zkoušení pevných látek, past a zrnitých látek se použije objem 0,1 ml nebo hmotnost nejvýše 100 mg. Zkoušená látka se rozemele na jemný prášek. Objem pevného materiálu se stanoví až po opatrném zhutnění, např. poklepáním odměrnou nádobkou. Pokud se pevná zkoušená látka z oka pokusného zvířete neodstranila pomocí fyziologických mechanismů do doby prvního pozorování po 1 h po aplikaci, lze oko vypláchnout fyziologickým roztokem nebo destilovanou vodou.

1.4.2.3.3 *Zkoušení aerosolů*

Před instilací látek do oka se doporučuje zachytit látky obsažené v rozstřikovačích nebo aerosolech do nádobky. Jedinou výjimkou jsou látky obsažené v aerosolové nádobce pod tlakem, které z důvodu odpařování zachytit nelze. V takových případech se oko podrží otevřené a látka se do oka aplikuje vstříknutím trvajícím jednu sekundu ze vzdálenosti 10 cm přímo před okem. Vzdálenost se může podle tlaku v rozprašovači a jeho obsahu lišit. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození oka tlakem z rozprašovače. V příslušných případech může být nutné vyhodnotit potenciál „mechanického“ poškození oka v důsledku rozprašovacího tlaku.

Dávku aerosolu lze odhadnout na základě této simulované zkoušky: látka se nastříká na odvažovací papír skrz otvor o velikosti králičího oka, přičemž tento otvor se nachází bezprostředně před papírem. Na základě zvýšení hmotnosti papíru se odhadne množství látky, která se vstříkne do oka. U těkavých látek lze dávku odhadnout pomocí zvážení odběrové nádobky před odstraněním zkoušené látky a po jejím odstranění.

1.4.2.4 *Počáteční zkouška (zkouška dráždivých/leptavých účinků na oči in vivo na jednom pokusném zvířeti)*

Jak je uvedeno ve strategii postupného zkoušení (viz tabulka 10), důrazně se doporučuje, aby byla zkouška *in vivo* provedena nejprve na jednom pokusném zvířeti.

Pokud výsledky této zkoušky naznačují, že látka má leptavé nebo vysoce dráždivé účinky na oči při použití popsáního postupu, další zkoušení dráždivých účinků na oči se neprovede.

1.4.2.5 *Lokální anestetika*

V jednotlivých případech lze použít lokální anestetika. Pokud analýza průkaznosti výsledků naznačuje, že látka může způsobit bolest, nebo pokud počáteční zkoušky ukazují, že se objeví bolestivá reakce, lze před instilací zkoušené látky použít lokální anestetika. Typ, koncentraci a dávku lokálního anestetika je třeba pečlivě zvolit, aby bylo zajištěno, že

v důsledku jeho použití nedojde k odlišným reakcím na zkoušenou látku. Podobně se musí znecitlivit i kontrolní oko.

1.4.2.6 *Potvrzující zkouška (zkouška dráždivých účinků na oči in vivo na dalších pokusných zvířatech)*

Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit na maximálně dalších dvou pokusných zvířatech. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován značný leptavý účinek, který naznačuje možný silný (nevratný) účinek v potvrzující zkoušce, doporučuje se provést potvrzující zkoušku metodou postupného zkoušení na jednom pokusném zvířeti spíše než exponováním dalších dvou pokusných zvířat současně. Pokud se u druhého pokusného zvířete projeví leptavé nebo vysoce dráždivé účinky, ve zkoušce se nepokračuje. K potvrzení slabých nebo mírných dráždivých reakcí může být nutné použít další pokusná zvířata.

1.4.2.7 *Doba pozorování*

Doba pozorování by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné plně zhodnotit míru a vratnost pozorovaných účinků. Zkouška by však měla být ukončena kdykoliv v okamžiku, kdy pokusné zvíře vykazuje přetrvávající příznaky značné bolesti nebo utrpení^{7a)}. Za účelem určení vratnosti účinků by se pokusná zvířata měla obvykle pozorovat 21 dnů po podání zkoušené látky. Pokud je vratnost pozorována před uplynutím 21 dnů, zkouška by se měla v tomto okamžiku ukončit.

1.4.2.7.1 *Klinická pozorování a hodnocení očních reakcí*

Oči se vyšetří po 1, 24, 48 a 72 h po podání zkoušené látky. Jakmile se získají konečné informace, nemělo by zkoušení na pokusných zvířatech probíhat déle, než je nezbytné. Pokusná zvířata se známkami přetrvávajících prudkých bolestí nebo utrpení se neprodleně humánně utratí a látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Humánně se utratí ta pokusná zvířata, u nichž došlo po instilaci k těmto očním lézím: perforace rohovky nebo výrazné zvředovatění rohovky včetně stafylomu; krev v přední komoře oční; zákal rohovky stupně 4 přetrvávající 48 h; absence reakce na osvit (reakce duhovky stupně 2) přetrvávající 72 h; zvředovatění spojivkové membrány; nekróza spojivek nebo slzné žlázy; nebo odlupování nekrotické hmoty. Tento postup je dán nevratností takových lézí.

Pokusná zvířata, u nichž oční léze nevzniknou, nelze utratit dříve než 3 dny po instilaci. Pokusná zvířata s mírnými až středními lézemi se pozorují, dokud léze nevymizí, nebo po 21 dnů, po jejichž uplynutí se studie ukončí. Po 7, 14 a 21 dnech se provádí pozorování, aby se určil stav lézí a jejich vratnost nebo nevratnost.

Stupeň reakce oka (spojivek, rohovky a duhovky) je třeba zaznamenat při každém vyšetření (tabulka 11). Uvedou se také jakékoli jiné oční léze (např. panus, zbarvení) nebo nežádoucí systémové účinky.

Vyšetřování reakcí lze usnadnit použitím binokulární lupy, ruční šterbinové lampy, očního mikroskopu nebo jiných vhodných zařízení. Po zaznamenání pozorování po 24 h mohou být oči pokusných zvířat dále vyšetřeny fluoresceinem.

Hodnocení očních reakcí je nevyhnutelně subjektivní. S cílem podporovat harmonizaci hodnocení očních reakcí a napomáhat zkušebními laboratořím a těm, kdo provádějí a interpretují pozorování, musí být zaměstnanci provádějící pozorování odpovídajícím způsobem kvalifikováni pro práci s používaným systémem vyhodnocování.

2 DATA

2.1 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Stupně dráždivých účinků na oči se zhodnotí ve spojení s povahou a stupněm závažnosti lézí a jejich vratností nebo nevratností. Jednotlivé stupně nepředstavují absolutní měřítko dráždivých vlastností látky, neboť se hodnotí také jiné účinky zkoušené látky. Jednotlivé stupně by spíše měly být považovány za referenční hodnoty, které jsou smysluplné, pouze pokud se opírají o úplný popis a hodnocení veškerých pozorování.

3 PROJEKT POKUSU, PROTOKOL POKUSU A ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

V souladu s příslušnými právními předpisy^{9),10)} musí být zpracován projekt pokusu a o průběhu pokusu je nutno vést protokol.

3.1 Zpráva o průběhu pokusu obsahuje následující informace.

zdůvodnění zkoušení *in vivo*: analýza průkaznosti výsledků předchozích pokusů, včetně výsledků strategie postupného zkoušení:

- popis relevantních údajů z předchozích zkoušek,
- údaje získané v každém kroku strategie zkoušení,
- popis provedených zkoušek *in vitro*, včetně podrobných údajů o postupech a o výsledcích získaných se zkoušenými/referenčními látkami,
- popis provedené studie dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*, včetně získaných výsledků,
- analýza průkaznosti výsledků odůvodňující provedení studie *in vivo*.

Zkoušená látka:

- identifikační údaje (např. číslo CAS, zdroj, čistota, známé nečistoty, šarže),

- fyzikální povaha a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. hodnota pH, těkavost, rozpustnost, stabilita, reaktivita s vodou),
- v případě směsi její složení a relativní podíl složek vyjádřený v procentech,
- je-li použito lokální anestetikum, jeho identifikace, čistota, typ, dávka a potenciální interakce se zkoušenou látkou.

Vehikulum:

- identifikace, koncentrace (podle potřeby), použitý objem,
- zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen, zdůvodnění použití jiných pokusných zvířat, není-li použit albín králíka,
- stáří každého pokusného zvířete na začátku studie,
- počet pokusných zvířat každého pohlaví ve zkušebních a kontrolních skupinách (je-li to nutné),
- hmotnosti jednotlivých pokusných zvířat na začátku a na konci zkoušky,
- původ, podmínky chovu, krmivo atd.

Výsledky:

- popis metody vyhodnocení dráždivosti při každém pozorování (např. ruční štěrbinová lampa, biomikroskop, fluorescein),
- údaje ve formě tabulky o reakcích na dráždivé nebo leptavé účinky u jednotlivých pokusných zvířat při každém pozorování až do vyjmutí každého pokusného zvířete ze zkoušky,
- podrobný popis stupně a charakteru pozorovaných dráždivých nebo leptavých účinků,
- popis všech dalších pozorovaných očních lézí (např. vaskularizace, tvorba panu, srůst sousedních tkání, zbarvení),
- popis místních a systémových nepříznivých účinků mimo oči a případné histopatologické nálezy.

Diskuse a interpretace výsledků.

Extrapolace výsledků studií dráždivých účinků na oči pokusných zvířat na člověka je platná jen v omezené míře. Albinotický králik je ve většině případů na dráždivé a žíravé látky pro oči citlivější než člověk.

Je třeba dbát na to, aby byla při interpretaci údajů vyloučena dráždivost pramenící ze sekundární infekce.

Závěry.

TABULKA 11: STUPNICE OČNÍCH LÉZÍ

Rohovka

Zákal: stupeň hustoty (vyšetří se nejvíce zakalené oblasti)*

Žádné zředovatění ani zákal	0
Rozptýlené nebo difúzní oblasti zákalu (jiné než slabé zastření normálního lesku), detaily duhovky jasně viditelné	1
Snadno identifikovatelná průhledná oblast, detaily duhovky lehce zastřené	2
Přítomnost zóny opalescence, detaily duhovky nejsou viditelné, velikost zornice stěží rozeznatelná	3
Úplná neprůhlednost rohovky, duhovka je zcela neviditelná	4

Maximálně možné: 4

* Zaznamená se oblast zákalu rohovky.

Duhovka

Normální	0
Výrazně prohloubené řasy, městnání, otoky, střední překrvení kolem rohovky, nebo překrvení při zánětu; rohovka reaguje na světlo (zpožděná reakce je považována za účinek).....	1
Krvácení, makroskopické poškození nebo bez reakce na světlo	2

Maximálně možné: 2

Spojivky

Zčervenání (podle nejzávažnější změny pozorované na víčkové nebo bulbární spojivce, kromě rohovky a duhovky)

Normální	0
Některé krevní cévy hyperemické (překrvené)	1
Difúzní, rudá barva, jednotlivé cévy nesnadno rozeznatelné	2
Difúzní temně rudá barva	3

Maximálně možné: 3

Otoky (chemosis)

(týká se víček nebo slzných žláz)

Normální	0
Slabě abnormální otok	1
Patrný otok, s částečným obrácením víček	2
Otok způsobující uzavření víček zhruba na polovinu	3
Otok způsobující uzavření víček více než na polovinu	4

Maximálně možné: 4

Tabulka 10**Strategie postupného zkoušení dráždivých a leptavých účinků na oči****OBECNÉ ÚVAHY**

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení s pokusnými zvířaty je důležité vyhýbat zbytečnému používání pokusných zvířat a minimalizovat jakékoli zkoušky, které u pokusných zvířat pravděpodobně vyvolají závažné reakce. Veškeré informace týkající se potenciálních leptavých/dráždivých účinků látky na oči by se měly hodnotit před zvažováním zkoušení *in vivo*. Může již existovat dostatek důkazů pro klasifikaci zkoušené látky podle jejího potenciálu dráždivých nebo leptavých účinků na oči, aniž by bylo nutné provádět zkoušky na pokusných zvířatech. Proto využití analýzy průkaznosti výsledků a strategie postupného zkoušení sníží potřebu provádět zkoušení *in vivo*, zejména pokud látka pravděpodobně vyvolá závažné reakce.

Doporučuje se, aby se stávající informace týkající se dráždivých a leptavých účinků látky na oči hodnotily pomocí analýzy průkaznosti výsledků, na jejímž základě se rozhodne o tom, zda by se k lepší charakteristice tohoto potenciálu měly provést další studie jiné než oční studie *in vivo*. Jsou-li nutné další studie, doporučuje se využít strategie postupného zkoušení a jejím prostřednictvím získat relevantní experimentální údaje. U látek, které doposud nebyly zkoušeny, by se měla strategie postupného zkoušení využít k získání údajů, které jsou nezbytné k vyhodnocení jejich leptavých nebo dráždivých účinků na oči. Strategie zkoušení popsána v této tabulce 10 byla vypracována na semináři OECD^{7a)}. Následně byla tato strategie potvrzena a rozpracována v Harmonizovaném integrovaném systému klasifikace nebezpečí chemických látek pro lidské zdraví a jejich vlivu na životní prostředí, který schválilo 28. společné zasedání Výboru pro chemické látky a Pracovní skupiny pro chemické látky v listopadu 1998^{7a)}.

Ačkoliv tato strategie postupného zkoušení není nedílnou součástí zkušební metody B.5, vyjadřuje doporučený postup stanovení dráždivých/leptavých účinků na oči. Tento postup představuje nejlepší praktický i etický standard pro zkoušení dráždivých/leptavých účinků na oči *in vivo*. Metoda zkoušení poskytuje pokyny pro provádění zkoušky *in vivo* a shrnuje faktory, kterým je nutno před zvažováním takové zkoušky věnovat pozornost. Strategie postupného zkoušení představuje přístup posuzování existujících údajů o dráždivých a leptavých účincích látek na oči a odstupňovaný přístup k získávání relevantních údajů o látkách, u kterých je nutné provést další studie, nebo u nichž žádné studie nebyly doposud provedeny. Součástí této strategie je provedení nejprve validovaných a uznaných zkoušek *in vitro* nebo *ex vivo* a poté za určitých okolností provedení studií dráždivých/leptavých účinků na kůži metodou zkoušení B.4^{7a)}.

POPIS STRATEGIE ZKOUŠENÍ PO KROCÍCH

Před zahájením zkoušek v rámci strategie postupného zkoušení (tabulka 10 pokračování) se vyhodnotí veškeré dostupné informace, aby se mohlo rozhodnout o nutnosti provést zkoušení *in vivo*. Ačkoliv lze významné informace získat z vyhodnocení jednotlivých parametrů (např. extrémní hodnota pH), stávající informace by se měly hodnotit jako celek. Všechny relevantní údaje o účincích zkoušené látky a jejích strukturních obdob se vyhodnotí na základě rozhodnutí založeném na průkaznosti výsledků. Mělo by se podat zdůvodnění tohoto rozhodnutí. Hlavní důraz by se měl klást na již existující údaje o účincích látky na člověka a zvířata a dále na výsledky zkoušení *in vitro* nebo *ex vivo*. Studie žíravých látek *in vivo* by se měly provádět co nejméně. Mezi faktory uvedené ve strategii zkoušení patří:

Hodnocení existujících údajů o účincích látky na člověka a zvířata (krok 1). Nejprve je nutné vzít v úvahu existující údaje o účincích na člověka, např. klinické studie nebo studie nemocí z povolání, záznamy subjektů hodnocení nebo údaje o zkouškách na pokusných zvířatech získaná z očních studií, protože z těchto dat lze získat informace přímo se vztahující k účinkům na oči. Poté se zhodnotí dostupné údaje ze studií na lidech nebo na pokusných zvířatech zabývajících se leptavými/dráždivými účinky na kůži. Látky, jejichž leptavé nebo vysoce dráždivé účinky na oči jsou známy, se do očí pokusných zvířat neaplikují. To platí rovněž pro látky vykazující leptavé nebo dráždivé účinky na kůži; takové látky se považují za látky s leptavými nebo dráždivými účinky rovněž na oči. Látky, o nichž byly v předchozích očních studiích získány dostatečné důkazy, že jsou nežíravé a nedráždivé, se v očních studiích *in vivo* také nezkoušejí.

Analýza vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR) (krok 2). Vezmou se v úvahu výsledky zkoušek strukturně příbuzných chemických látek, jsou-li k dispozici. Pokud jsou k dispozici dostatečné údaje o účincích strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí na člověka nebo zvířata naznačující, že mají potenciál leptavých/dráždivých účinků na oči, lze předpokládat, že zkoušená látka vyvolá stejné reakce. V takových případech není nutné tuto látku zkoušet. Negativní údaje získané ze studií strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí nezakládají podle strategie postupného zkoušení dostatečný důkaz nežíravosti/nedráždivosti látky. Ke stanovení potenciálu leptavých/dráždivých účinků na kůži i oči by měl být použitý validované a uznané postupy vycházející z analýzy SAR.

Fyzikálně-chemické vlastnosti a chemická reaktivita (krok 3). Látky vykazující extrémní hodnoty pH jako $\leq 2,0$ nebo $\geq 11,5$ mohou mít silné místní účinky. Pokud se leptavé nebo dráždivé účinky látky na oči stanoví na základě extrémních hodnot pH, lze také vzít v úvahu kyselou/alkalickou rezervu (pufrační kapacitu)^{7a)}. Pokud lze podle puфраční kapacity soudit, že látka možná nemá leptavé účinky na oči, musí tento předpoklad potvrdit další zkoušky, pokud možno s využitím validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* (viz kroky 5 a 6).

Zvážení dalších existujících informací (krok 4). V této fázi se vyhodnotí veškeré dostupné informace o systémové toxicitě dermální cestou. Vezme se v úvahu také akutní dermální toxicita zkoušené látky. Pokud se u zkoušené látky ukázalo, že je při podání dermální cestou vysoce toxická, nemusí být nutné zkoušet ji na oku. Ačkoliv mezi akutní dermální toxicitou a dráždivými/leptavými účinky na oči nemusí nezbytně existovat souvislost, lze se domnívat, že pokud je látka při podání dermální cestou vysoce toxická, bude vysokou toxicitu vykazovat také při instilaci podání do oka. Takové údaje lze také vzít v úvahu mezi kroky 2 a 3.

Výsledky ze zkoušek in vitro nebo ex vivo (kroky 5 a 6). Látky, které vykazovaly leptavé nebo výrazně dráždivé vlastnosti ve zkoušce *in vitro* nebo *ex vivo*^{7a)}, která byla validována a uznána pro hodnocení výlučně leptavých/dráždivých účinků na oči nebo na kůži, není nutné zkoušet na pokusných zvířatech. Lze předpokládat, že takové látky vyvolají ve zkoušce *in vivo* podobné závažné účinky. Nejsou-li validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* k dispozici, kroky 5 a 6 se přeskočí a přejde se přímo ke kroku 7.

Posouzení dráždivých nebo leptavých účinků na kůži in vivo (krok 7). Pokud stávající důkazy k provedení přesvědčivé analýzy průkaznosti výsledků potenciálních dráždivých/leptavých účinků látky na oči opírající se o údaje z výše uvedených studií nepostačují, nejprve se s využitím metody B.4^{7a)} a průvodní přílohy^{7a)} vyhodnotí potenciál dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*. Jestliže se u látky prokáží leptavé nebo silně dráždivé účinky na kůži, považuje se za látku s leptavými a dráždivými účinky na oči, pokud odlišný závěr nepodporují jiné informace. Oční zkoušku *in vivo* by tak nebylo nutné provádět. Pokud látka leptavé nebo výrazně dráždivé účinky na kůži nemá, oční zkouška *in vivo* se provede.

Zkouška *in vivo* na králících (kroky 8 a 9). Oční zkoušení *in vivo* se zahájí počáteční zkouškou na jednom pokusném zvířeti. Pokud výsledky této zkoušky naznačují, že látka má silně dráždivé nebo leptavé účinky na oči, nemělo by se další zkoušení provádět. Pokud zkouška žádné leptavé nebo silně dráždivé účinky neodhalí, provede se potvrzující zkouška na dvou dalších pokusných zvířatech.

Tabulka 10 pokračování

STRATEGIE ZKOUŠENÍ A HODNOCENÍ DRÁŽDIVÝCH/LEPTAVÝCH ÚČINKŮ NA OČI

	Aktivita	Nález	Závěr
1	Existující údaje o účincích na lidské nebo zvířecí oči	Závažné poškození očí	Dominantní ukazatel; považována za žíravou pro oči. Není nutné zkoušet.
		Dráždivá pro oči	Dominantní ukazatel; považována za dráždivou pro oči. Není nutné zkoušet.
		Nežíravá nebo nedráždivá pro oči	Dominantní ukazatel; považována za nežíravou a nedráždivou pro oči. Nevyžaduje zkoušet.
	Existující údaje o leptavých účincích na lidskou nebo zvířecí kůži	Leptavé účinky na kůži	Předpoklad leptavých účinků na oči. Není nutné zkoušet.
	Existující údaje o silně dráždivých účincích na lidskou nebo zvířecí kůži	Silně dráždivé účinky na kůži	Předpoklad dráždivých účinků na oči. Není nutné zkoušet.
	↓		
	<i>Nejsou k dispozici žádné informace, nebo informace nejsou přesvědčivé</i>		
	↓		
2	Proveďte hodnocení leptavých/dráždivých účinků na oči podle analýzy SAR	Předpoklad závažného poškození očí	Předpoklad žíravosti pro oči. Není nutné zkoušet.
		Předpoklad dráždivých účinků na oči	Předpoklad dráždivosti pro oči. Není nutné zkoušet.
	Proveďte analýzu SAR leptavých účinků na kůži	Předpoklad leptavých účinků na kůži	Předpoklad žíravosti pro oči. Není nutné zkoušet.
	↓		

Aktivita	Nález	Závěr
<p><i>Nelze stanovit žádné předpoklady, nebo jsou předpoklady nepřesvědčivé nebo negativní</i></p>		
<p>↓</p> <p>3 Změřte hodnotu pH (pufrační kapacita, je-li významná)</p>	<p>pH ≤ 2 nebo ≥ 11,5 (s vysokou pufrační kapacitou, pokud je významná)</p>	<p>Předpoklad žíravosti pro oči. Není nutné zkoušet.</p>
<p>↓</p> <p><i>2 < pH < 11,5, nebo pH ≤ 2 nebo ≥ 11,5 s nízkou/žádnou pufrační kapacitou, pokud je významná</i></p>		
<p>↓</p> <p>4 Posuďte systémovou toxicitu dermální cestou</p>	<p>Vysoce toxické při koncentracích, které by byly zkoušeny na očích.</p>	<p>Látka by byla pro zkoušení příliš toxická. Není nutné zkoušet.</p>
<p>↓</p> <p><i>Takové informace nejsou k dispozici, nebo látka není vysoce toxická</i></p>		
<p>↓</p> <p>5 Proved'te validovanou a uznanou zkoušku leptavých účinků na oči <i>in vitro</i> nebo <i>ex vivo</i></p>	<p>Leptavé účinky</p>	<p>Předpoklad leptavých účinků na oči. Není třeba žádné další zkoušení.</p>
<p>↓</p> <p><i>Látka není žíravá, nebo validované metody zkoušení žíravosti pro oči <i>in vitro</i> nebo <i>ex vivo</i> dosud nejsou k dispozici</i></p>		
<p>↓</p> <p>6 Proved'te validovanou a uznanou zkoušku dráždivých účinků na oči <i>in vitro</i> nebo <i>ex vivo</i></p>	<p>Dráždivé účinky</p>	<p>Předpoklad dráždivých účinků na oči. Není třeba žádné další zkoušení.</p>

Aktivita	Nález	Závěr
↓ <i>Látka není dráždivá, nebo validované metody zkoušení dráždivých účinků na oči in vitro nebo ex vivo dosud nejsou k dispozici</i> ↓		
7 Experimentálně vyhodnoťte potenciál dráždivých nebo leptavých účinků na kůži <i>in vivo</i> (viz metoda zkoušení B.4, včetně její přílohy)	Leptavé nebo silně dráždivé účinky	Předpoklad leptavých účinků na oči. Není třeba žádné další zkoušení.
↓ <i>Látka není žíravá ani silně dráždivá pro kůži</i> ↓		
8 Proved'te počáteční oční zkoušku na králících <i>in vivo</i> na jednom pokusném zvířeti	Závažné poškození očí	Považována za dráždivou pro oči. Není třeba žádné další zkoušení.
↓ <i>Žádné výrazné poškození, nebo žádná odezva</i> ↓		
9 Proved'te potvrzující zkoušku na jednom nebo dalších dvou pokusných zvířatech	Žíravá nebo dráždivá	Považována za žíravou nebo dráždivou pro oči. Není třeba žádné další zkoušení.
	Nežíravá nebo nedráždivá	Považována za nedráždivou a nežíravou pro oči. Není třeba žádné další zkoušení.“.

9. V příloze č. 2 název metody B.27 TEST SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ TOXICITY (90ti-denní studie orální toxicity s opakovanou aplikací hlodavcům, zní:

„B.27 TEST SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ TOXICITY

(90denní studie orální toxicity s opakovanou aplikací nehlodavcům)“.

10. V příloze č. 2 metoda B.31 STUDIE TERATOGENITY – HLODAVCI A NEHLODAVCI zní:

„B.31 STUDIE PRENATÁLNÍ VÝVOJOVÉ TOXICITY

1 METODA je v souladu s právem Evropských společenství^{7a)}.

1.1 ÚVOD

Tato metoda zkoušení vývojové toxicity je určena k získání všeobecných informací týkajících se účinku prenatální expozice na březí pokusné zvíře a na organismus vyvíjející se v děloze; tyto informace mohou zahrnovat jak hodnocení účinku na matku, tak i vliv na uhynutí, strukturální odchylky nebo změněný růst plodu. I když funkční poruchy tvoří významnou část vývoje, nejsou součástí této metody. Zkoušky na tyto poruchy mohou být prováděny v samostatné studii nebo jako doplněk této studie pomocí zkušební metody pro studii vývojové neurotoxicity. Informace o zkoušení funkčních poruch a jiných postnatálních účinků lze v případě potřeby získat z dvougenerační zkoušky toxicity pro reprodukci a zkoušky vývojové neurotoxicity.

Tato zkušební metoda může ve specifických případech vyžadovat určitou úpravu na základě specifických znalostí např. fyzikálně-chemických nebo toxikologických vlastností zkoušené látky. Tato úprava je přijatelná, jestliže přesvědčivé vědecké důkazy svědčí o tom, díky této úpravě bude mít zkouška vyšší vypovídací hodnotou. V takovém případě je třeba tyto vědecké důkazy pečlivě zdokumentovat ve zprávě o studii.

1.2 DEFINICE

Vývojová toxikologie: studie nepříznivých účinků na vyvíjející se organismus, které mohou vyplývat z expozice před početím, během prenatálního vývoje nebo v postnatálním období až do doby pohlavní zralosti. Hlavní projevy vývojové toxicity zahrnují 1) úhyn organismu, 2) strukturální odchylky, 3) změněný růst a 4) funkční poruchu. Vývojová toxikologie se původně nazývala teratologie.

Nepříznivý účinek: jakákoliv odchylka od normálního stavu spojená s aplikací, která snižuje schopnost organismu přežít, rozmnožovat se nebo se přizpůsobit prostředí. Pokud jde o vývojovou toxikologii v nejširším

slova smyslu, zahrnuje tento pojem jakýkoliv účinek, který brání normálnímu vývoji plodu, a to jak před narozením, tak i po něm.

Změněný růst: změna hmotnosti nebo velikosti orgánu nebo těla u potomstva.

Odchylky (anomálie): strukturální změny ve vývoji, které zahrnují jak malformace, tak i odchylky^{7a)}.

Malformace/velká odchylka: strukturální změna považovaná za škodlivou pro pokusné zvíře (může být i letální); obvykle je vzácná.

Odchylka/malá odchylka: strukturální změna, která nemá žádný nebo má jen malý škodlivý účinek na pokusné zvíře; může být přechodná a u kontrolní populace se může vyskytovat poměrně často.

Zárodek: celkové množství derivátů oplodněného vajíčka v jakékoliv fázi vývoje od oplodnění až do narození, včetně dalších zárodečných membrán, embrya nebo plodu.

Implantace (nidace): přichycení blastocysty k epitelové výstelce dělohy, včetně její penetrace do děložního epitelu a zahnízdění v děložní sliznici.

Embryo: raná nebo vývojová fáze organismu, a to zvláště plod vyvíjející se po oplodnění vajíčka poté, co se objeví dlouhá osa, a dokud nejsou přítomné všechny hlavní struktury.

Embryotoxicita: toxicita škodlivá pro normální strukturu, vývoj, růst nebo životaschopnost embrya.

Fétus: nenarozený potomek v post-embryonálním období.

Fetotoxicita: toxicita škodlivá pro normální strukturu, vývoj, růst nebo životaschopnost plodu.

Potrat: předčasné vyloučení produktů oplodnění – embrya nebo plodu neschopného života – z dělohy.

Resorpce: zárodek, který po implantaci do dělohy později odumřel a vstřebává se nebo se již vstřebal.

Raná resorpce: důkaz o zahnízdění (implantaci) bez rozeznatelného embrya/plodu.

Pozdní resorpce: mrtvé embryo nebo plod se zevními degenerativními změnami.

1.3

REFERENČNÍ LÁTKA

Žádná.

1.4 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Obvykle se zkušební látka podává březím pokusným zvířatům od implantace až do dne před plánovaným usmrcením, který by se měl co nejvíce přiblížit očekávanému dni vrhu, aniž se riskuje ztráta údajů v důsledku předčasného vrhu. Zkušební metoda není určena výhradně ke zkoumání období organogeneze (např. 5. – 15. den u hlodavce a 6. – 18. den u králíka), ale popřípadě rovněž ke zkoumání účinků před implantací, pro celé období gestace a až do dne před císařským řezem. Krátce před císařským řezem se samice usmrtí, prozkoumá se děložní obsah a u plodů se vyhodnotí zevní viditelné anomálie, změny měkkých tkání a skeletu.

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1 Výběr živočišných druhů

Doporučuje se provádět zkoušení s nejvhodnějšími druhy a využívat laboratorní druhy a kmeny, které se běžně používají při zkoušení prenatalní vývojové toxicity. Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan a upřednostňovaným druhem nehlodavce je králík. Použití jiného druhu je třeba odůvodnit.

1.5.2 Podmínky chovu a krmení

Teplota ve zkušební místnosti pro pokusná zvířata by měla být $(22 \pm 3) ^\circ\text{C}$ pro hlodavce a $(18 \pm 3) ^\circ\text{C}$ pro králíky. Relativní vlhkost by měla být alespoň 30 %, neměla by však překročit 70 % během čištění místnosti a cílem je hodnota 50 – 60 %. Osvětlení by mělo být umělé, mělo by se střídát 12 h světla a 12 h tmy, není-li v chovné místnosti denní světlo. Ke krmení lze použít obvyklé krmivo určené pro pokusná zvířata od registrovaného výrobce s neomezenou dodávkou pitné vody.

Páření by mělo probíhat v klecích vhodných k tomuto účelu v souladu s příslušným právním předpisem¹⁰⁾, pokud není stanoveno projektem pokusů jinak. I když se dává přednost individuálnímu chovu spářených pokusných zvířat, přípustný je rovněž chov v malých skupinkách.

1.5.3 Příprava pokusných zvířat

Pokusná zvířata jsou vybrána s ohledem na druh, pohlaví a stáří v souladu s ustanovením § 15 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾ a označena tak, aby byla možná identifikace jednotlivých pokusných zvířat. Dobu navykání stanoví § 10 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾. Pokusná zvířata by měla být charakterizována podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti nebo stáří. Je-li to možné, měla by mít pokusná zvířata ze všech testovaných skupin stejnou hmotnost a věk. Pro každou úroveň dávek se použijí mladé dospělé samice, které by měly být nullipary. Samice se spáří se samci stejného druhu a kmene a nemělo by docházet k páření sourozenců. U hlodavců je nultým dnem gestace den, kdy se pozoruje vaginální zátka nebo sperma; u králíků je dnem 0 obvykle den páření nebo umělé

inseminace, pokud se tato metoda používá. Oplodněné samice se náhodným výběrem rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Každému pokusnému zvířeti se přiřadí jednoznačné identifikační číslo. Náhodným výběrem se oplodněné samice rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin, a jsou-li samice pářené v sadách, rozdělí se pokusná zvířata z jednotlivých sad rovnoměrně do všech skupin. Stejně tak se do všech skupin rozdělí samice oplodněné stejným samcem.

1.6 POSTUP

1.6.1 Počet a pohlaví pokusných zvířat

Každá experimentální a kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet samic, abychom při pitvě získali přibližně 20 samic s implantací plodu. Skupiny s méně než 16 pokusnými zvířaty s implantací plodu nejsou vhodné. Mortalita samic nemusí nutně znamenat znehodnocení studie za předpokladu, že nepřekročí přibližně 10 %.

1.6.2 Příprava dávek

Pokud se pro usnadnění dávkování používá vehikulum nebo jiná přísada, je třeba vzít v úvahu následující typické znaky: vliv na absorpci, distribuci, metabolismus a retenci nebo vylučování zkoušené látky; vliv na chemické vlastnosti zkoušené látky, která může pozměnit svoje toxické znaky, a vliv na spotřebu krmiva nebo vody anebo nutričního stavu pokusných zvířat. Vehikulum by nemělo být ani vývojově toxické, ani by nemělo mít vliv na rozmnožování.

1.6.3 Dávkování

Zkoušená látka se obvykle podává denně od implantace (např. pátý den po spáření) až do dne před plánovaným císařským řezem. Pokud z případných předběžných studií nevyplývá vysoký potenciál předimplantační ztráty, lze aplikaci prodloužit tak, aby zahrnovala celé období gestace, od spáření až do dne před plánovaným usmrcením. Je známo, že nevhodné zacházení nebo stres během březosti může vést k prenatalní ztrátě. S cílem zabránit prenatalním ztrátám z důvodů, které nejsou spojeny s expozicí, je nutné zamezit jak nadbytečné manipulaci s pokusnými zvířaty, tak i stresu způsobenému zevními faktory, jako je např. hluk.

Použijí se alespoň tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Zdravá pokusná zvířata se náhodným výběrem rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin. Úrovně dávek se rozloží tak, aby byly toxické účinky odstupňovány. Pokud neexistuje žádné omezení fyzikální/chemickou podstatou nebo biologickými vlastnostmi zkoušené látky, zvolí se nejvyšší dávka s cílem vyvolat určitou vývojovou toxicitu nebo toxicitu pro matku (klinické znaky nebo snížení tělesné hmotnosti), ale nikoliv uhynutí nebo silné bolesti. Alespoň jedna střední úroveň dávek by měla vyvolat

minimální zjistitelné toxické účinky. Nejnižší úroveň dávky by neměla vyvolat žádnou prokazatelnou toxicitu pro matku ani vývojovou toxicitu. S ohledem na prokázání jakékoli reakce související s dávkováním a s úrovní dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) by se měla zvolit sestupná posloupnost úrovní dávek. Pro nastavení sestupných úrovní dávek jsou obvykle optimální dvoj- až čtyřnásobné intervaly a často je vhodnější přidání čtvrté exponované skupiny než používání velkých intervalů mezi dávkami (např. lišících se faktorem 10). Ačkoliv je cílem stanovit hodnotu NOAEL pro samici, přijatelné jsou rovněž studie, které tuto hodnotu nestanoví^{7a)}.

Při výběru úrovní dávek je třeba brát v úvahu jakékoli existující údaje o toxicitě a také jako další informace o metabolismu a toxikokinetice zkoušené látky nebo látek příbuzných. Tyto informace pomohou rovněž při prokazování přiměřenosti dávkovacího režimu.

Použije se souběžná kontrolní skupina. Tato skupina by měla tvořit zdánlivě léčenou kontrolní skupinu nebo kontrolní skupinu s vehikulem, pokud se vehikulum při podávání zkoušené látky používá. Všem skupinám se podává stejné množství zkoušené látky nebo vehikula. S pokusnými zvířaty v kontrolní skupině (kontrolních skupinách) se zachází stejně jako s pokusnými zvířaty v experimentální skupině. Kontrolní skupina s vehikulem by měla dostat vehikulum v nejvyšším používaném množství (jako u experimentální skupiny s nejnižší dávkou).

1.6.4 **Limitní zkouška**

Pokud zkouška na jedné úrovni dávky v množství alespoň 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den při orálním podávání nevyvolá při použití postupů předepsaných pro tuto studii žádnou zjistitelnou toxicitu ani u březích pokusných zvířat ani u jejich plodů, a pokud se neočekává účinek ani na základě existujících údajů (např. o sloučeninách s podobnou strukturou nebo metabolismem), není nezbytné uvažovat o kompletní studii využívající tři úrovní dávek. Je možné, že předpokládaná expozice u člověka si vyžádá použití vyšší orální dávky v limitní zkoušce. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň expozice dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušené látky (např. kožní aplikace by neměla způsobit závažnou lokální toxicitu).

1.6.5 **Aplikace dávek**

Zkoušená látka nebo vehikulum se obvykle podává orálně intubací. Pokud se používá jiný způsob aplikace látky, měl by experimentátor volbu zdůvodnit a objasnit, přičemž může být nezbytné provést odpovídající změny^{7a)}. Zkoušená látka se podává každý den přibližně ve stejnou dobu.

Obvykle by dávka pro jednotlivá pokusná zvířata měla vycházet z aktuální zjištěné tělesné hmotnosti. Je však nutné věnovat velkou pozornost úpravě dávky během posledního trimestru březosti. Dávka by se měla zvolit na základě existujících údajů, aby se zabránilo nadměrné toxicitě u samic.

Pokud je však u ošetřovaných samic zaznamenána nadměrná toxicita, tato pokusná zvířata se humánním způsobem usmrtí. Pokud několik březích pokusných zvířat vykazuje známky nadměrné toxicity, mělo by se zvážit usmrcení této skupiny. Je-li látka podávána prostřednictvím žaludeční sondy, měla by se pokusným zvířatům podávat ve formě jediné dávky pomocí hadičky k výplachu žaludku nebo vhodné intubační kanyly. Maximální množství tekutiny, které lze jednorázově podávat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Toto množství by nemělo překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Pokud se jako vehikulum používá kukuřičný olej, nemělo by množství překročit 0,4 ml/100 g tělesné hmotnosti. Kolísání v množství zkoušené látky by se měla omezit nastavením koncentrací tak, aby se zajistilo konstantní množství na všech úrovních dávek.

1.6.6 **Sledování samic**

Klinická pozorování se provádějí a zaznamenávají minimálně jednou denně, a to každý den nejlépe ve stejnou dobu, a přihlédně se k době vrcholícího předpokládaného účinku po dávkování. Zaznamená se stav pokusných zvířat včetně mortality, agónie, relevantních změn chování a všech příznaků zjevné toxicity.

1.6.7 **Tělesná hmotnost a spotřeba krmiva**

Pokusná zvířata se zváží během nultého dne gestace anebo nejpozději 3. dne gestace, pokud externí chovatel dodává pokusná zvířata spářená ve stejnou dobu a dále během prvního dne podávání látky, minimálně každý 3. den v období podávání látky a v den plánovaného usmrcení.

Spotřeba krmiva se zaznamená v třídením intervalu a měla by se shodovat se dny zjišťování tělesné hmotnosti.

1.6.8 **Pitva**

Samice se usmrtí jeden den před očekávaným dnem vrhu. Samice vykazující známky potratu nebo předčasného vrhu předcházejícího plánovanému usmrcení se usmrtí a podrobí důkladnému makroskopickému vyšetření.

Samice se v okamžiku usmrcení nebo úhynu během studie makroskopicky vyšetří na strukturní odchylky nebo patologické změny. S cílem minimalizovat neobjektivnost se vyhodnocení samic během císařského řezu a následná fetální analýza provedou pokud možno bez znalosti experimentální skupiny.

1.6.9 **Vyšetření děložního obsahu**

Okamžitě po usmrcení nebo co nejdříve po uhynutí se samicím vyjme děloha a zjistí se stav březosti. Dělohy, které nesvědčí o graviditě, se dále vyšetří (např. pomocí barvení sulfidem amonným u hlodavců a pomocí

Salewského barvení nebo vhodnou alternativní metodou u králíků) a potvrdí se negravidní stav^{7a)}.

Gravidní děloha včetně děložního hrdla se zvaží. Hmotnost gravidní dělohy by se neměla zjišťovat u pokusných zvířat, která během studie uhynula.

U březích pokusných zvířat se zjistí počet žlutých tělísek.

U děložního obsahu se vyšetří počet úhynů embrya nebo plodu a počet životaschopných plodů. Popíše se stupeň resorpce, aby bylo možné odhadnout relativní dobu uhynutí zárodku (viz část 1.2).

1.6.10 **Vyšetření plodů**

Zjistí se pohlaví a tělesná hmotnost každého plodu.

U každého plodu se vyšetří zevní odchyly^{7a)}.

U plodů se vyšetří změny kostry a měkkých tkání (např. odchyly a malformace nebo anomálie)^{7a)}. Kategorizace fetálních změn je vhodná, ale nikoli nezbytná. Pokud se kategorizace provede, měla by se jasně stanovit kritéria definování jednotlivých kategorií. Zvláštní pozornost je třeba věnovat rozmnožovací soustavě, která se vyšetří na přítomnost známek změněného vývoje.

U hlodavců se připraví přibližně polovina každého vrhu, u něhož se vyšetří změny skeletu. Zbytek se připraví a vyšetří na přítomnost změn měkkých tkání pomocí uznaných nebo vhodných metod postupného krájení histologických řezů nebo důkladné pitvy.

U nehlodavců, např. králíků, se prozkoumají jak změny měkkých tkání, tak změny skeletu všech plodů. Opatrným oddělením tkání se u těchto plodů vyšetří změny měkkých tkání, přičemž pitva může zahrnovat i postupy pro další vyhodnocení vnitřní stavby srdce^{7a)}. Hlavy poloviny plodů zkoumaných tímto způsobem se oddělí a použijí se k vyhodnocení změn měkkých tkání (včetně očí, mozku, nosních dutin a jazyka), a to pomocí standardních metod postupného segmentování^{7a)} nebo stejně citlivých metod. Těla těchto i zbývajících neporušených plodů se připraví a vyšetří na přítomnost změn skeletu za použití stejných metod popsanych pro hlodavce.

2 **DATA**

2.1 **ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Výsledky se zaznamenají do tabulky samostatně pro samice a pro jejich potomky a u každé pokusné skupiny a každé generace se uvede počet pokusných zvířat na začátku zkoušky, počet pokusných zvířat uhynulých během zkoušky nebo usmrčených z humanitních důvodů, doba úhynu nebo humanitního usmrcení, počet březích samic, počet pokusných zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis příznaků zjištěné toxicity včetně

nástupu, trvání a závažnosti případných toxických účinků, typy pozorování embryí/plodů a všechny důležité údaje o vrhu.

Numerické výsledky se vyhodnotí vhodnou statistickou metodou, přičemž jako jednotka analýzy dat se použije vrh. Použije se všeobecně uznávaná statistická metoda; zvolí se jako součást návrhu studie a musí být zdůvodněna. Rovněž se uvedou údaje získané u pokusných zvířat, která nepřežila až do plánovaného usmrcení. Tyto údaje lze v případě potřeby zahrnout do skupinového průměru. Význam údajů získaných od těchto pokusných zvířat i jejich zahrnutí nebo nezahrnutí do průměru skupiny by měly být odůvodněny a individuálně posouzeny.

2.2 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky studie prenatalní vývojové toxicity se vyhodnotí na základě zjištěných účinků. Vyhodnocení musí zahrnovat následující informace:

- výsledky zkoušky u samic a embrya/plodu, včetně hodnocení vazeb nebo jejich absence mezi expozicí pokusných zvířat zkoušené látce a výskytem a závažností všech nálezů,
- kritéria používaná pro kategorizaci zevních změn, změn měkkých tkání a skeletu u plodu, pokud byla tato kategorizace provedena,
- popřípadě předchozí kontrolní údaje k snazšímu objasnění výsledků studie,
- číselné hodnoty používané při výpočtu všech procentuálních hodnot nebo koeficient,
- případně odpovídající statistickou analýzu výsledků studie, která by měla zahrnovat dostatečné informace o metodě analýzy, aby nezávislý posuzovatel mohl tuto analýzu přehodnotit a zrekonstruovat.

V jakékoliv studii, která prokazuje nepřítomnost toxických účinků, je třeba zvážit další zkoušky pro zjištění absorpce a biologické dostupnosti zkoušené látky.

2.3 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Studie prenatalní vývojové toxicity poskytne informace o účinku opakované expozice látky na březí samice a na nitroděložní vývoj jejich potomstva. Výsledky studie by měly být objasněny v souvislosti s výsledky ze subchronických, reprodukčních, toxikokinetických a dalších studií. Vzhledem k tomu, že se klade důraz jak na výslednou všeobecnou toxicitu z hlediska matky, tak i na vývojovou toxicitu, umožní výsledky této studie do určité míry rozlišit mezi vývojovými účinky vyskytujícími se v nepřítomnosti všeobecné toxicity a mezi účinky vyvolanými pouze na úrovních, které jsou toxické i pro březí pokusná zvířata^{7a)}.

3 **PROJEKT POKUSU, PROTOKOL POKUSU A ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA**

V souladu s příslušnými právními předpisy^{9),10)} musí být zpracován projekt pokusu a o průběhu pokusu je nutno vést protokol.

3.1 Zpráva o průběhu pokusu obsahuje následující informace.

Zkoušená látka:

- fyzikální povaha, a je-li to důležité, fyzikálně-chemické vlastnosti,
- identifikace včetně čísla CAS, je-li známo nebo přiděleno,
- čistota.

Vehikulum (pokud bylo použito):

- zdůvodnění výběru jiného vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

- použité druhy a kmeny,
- počet a stáří pokusných zvířat,
- původ, podmínky chovu, krmivo atd.,
- individuální hmotnosti pokusných zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

- zdůvodnění výběru úrovně dávky,
- podrobnosti o přípravě složení zkoušené látky/krmiva, dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,
- podrobné údaje o podávání zkoušené látky,
- v případě potřeby přepočítání koncentrace zkoušené látky (ppm) v krmivu/pitné vodě na skutečnou dávku (mg/kg tělesné hmotnosti na den), je-li to možné,
- podmínky prostředí,
- podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody.

Výsledky:

Údaje o příznacích toxicity u matky podle dávky, např.:

- počet pokusných zvířat na začátku zkoušky, počet pokusných zvířat, která přežila, počet březích pokusných zvířat, počet pokusných zvířat, která potratila, a počet pokusných zvířat, která předčasně vrhla,
- den úhynu během studie anebo zda pokusná zvířata přežila až do dne usmrcení,
- uvedou se údaje o pokusných zvířatech, která nepřežila do plánovaného usmrcení, nezahrnou se však do statistických srovnání dat pro skupiny,
- den zjištění každého abnormálního klinického příznaku a jeho následný průběh,
- tělesná hmotnost, změna tělesné hmotnosti a hmotnosti gravidní dělohy, včetně případných údajů o změně tělesné hmotnosti korigované o hmotnost gravidní dělohy,
- spotřeba krmiva, měřili se, spotřeba vody,
- pitevní nálezy včetně děložní hmotnosti,
- zaznamenají se hodnoty NOAEL pro účinky na matku a vývojové účinky.

Ukazatele vývojové toxicity podle dávky pro vrhy s implantáty, včetně

- počtu žlutých tělísek,
- počtu zahnízdění, počtu a procenta živých a mrtvých plodů a resorpce,
- počtu procentuálního podílu pre- a post-implantačních ztrát.

Ukazatele vývojové toxicity podle dávky pro vrhy s živými plody, včetně

- počtu a procentuálního podílu živých potomků,
- poměru pohlaví,
- fetální tělesné hmotnosti, pokud možno podle pohlaví a pro obě pohlaví dohromady,
- zevních malformací, malformací měkkých tkání a skeletu a jiných významných odchylek,

- případně kritérií kategorizace,
- celkového počtu a procentuálního podílu plodů a vrhů s jakýmkoli zevními a kosterními odchylkami, odchylkami měkkých tkání a rovněž typů a výskytů individuálních anomálií a jiných významných odchylek.

Diskuse a interpretace výsledků.

Závěry.“.

11. V příloze č. 2 metoda B.35 REPRODUKČNÍ TOXICITA – DVOUGENERAČNÍ TEST zní:

„B.35 DVOUGENERAČNÍ STUDIE REPRODUKČNÍ TOXICITY

1 METODA je v souladu s právem Evropských společenství^{7a)}.

1.1 ÚVOD

Tato metoda zkoušení dvougenerační reprodukce je určena k získání všeobecných informací týkajících se účinků zkoušené látky na integritu a výkonnost samčí a samičí rozmnožovací soustavy, včetně funkcí pohlavních žláz, estrálního cyklu, způsobu chování při páření, plození, gestaci, vrhu, laktaci, odstavení, růstu a vývoje potomstva. Studie může rovněž poskytnout informace o účinku zkoušené látky na neonatální úmrtnost, mortalitu a předběžné informace o prenatalní a postnatální vývojové toxicitě a může sloužit jako návod pro další zkoušky. Mimo zkoumání růstu a vývoje generace F1 je tato zkušební metoda určena rovněž k hodnocení integrity a výkonnosti samčí a samičí rozmnožovací soustavy a rovněž růstu a vývoje generace F2. S cílem získat další informace o vývojové toxicitě a funkčních poruchách lze do tohoto protokolu začlenit další prvky studie, přičemž jako vhodné se jeví metody vývojové toxicity nebo vývojové neurotoxicity, anebo lze tyto konečné výsledky zkoumat v samostatných studiích pomocí vhodných metod zkoušení.

1.2 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám samců a samic. Samcům z generace P se látka podává během růstu a během minimálně jednoho dokončeného spermatogenetického cyklu (přibližně 56 dnů u myši a 70 dnů u potkana), aby bylo možné zachytit jakékoliv nepříznivé účinky na spermatogenezi. Účinky na spermie se stanoví pomocí parametrů pro spermie (např. morfologie a motilita

spermií) a z přípravy tkání a podrobné histopatologie. Jsou-li k dispozici informace o spermatogenezi z předešlých dostatečně dlouhých studií opakovaného dávkování, např. 90 denní studie, není do hodnocení nutné zahrnovat samce z generace P. Tyto vzorky nebo digitální záznamy o spermiích z generace P je však vhodné uchovat pro možnost pozdějšího vyhodnocení. Samicím z generace P se látka podává během růstu a během několika dokončených estrálních cyklů, aby bylo možné odhalit jakékoliv nepříznivé účinky zkoušené látky na normální průběh estrálního cyklu. Zkoušená látka se podává rodičovské (P) generaci pokusných zvířat během jejich páření, následné březosti a až do doby odstavení jejich potomstva F1. Po odstavení se u generace F1 v podávání látky pokračuje během růstu až do dospělosti, v průběhu páření a produkce generace F2 a až do doby, kdy dojde k odstavení generace F2.

U všech pokusných zvířat se provádějí klinická sledování a patologická vyšetření příznaků toxicity, a to se zvláštním důrazem na její vliv na integritu a výkonnost samčí a samičí rozmnožovací soustavy a na růst a vývoj jejich potomstva.

1.3 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.3.1 Výběr živočišných druhů

Nejvhodnějším druhem pro testování je potkan. Pokud se použijí jiné druhy, je třeba podat zdůvodnění a provést odpovídající úpravy. Není vhodné používat druhy s nižší plodností nebo s typicky vysokým výskytem vývojových vad. Na začátku studie by měly být u používaných pokusných zvířat jen minimální odchylky hmotnosti, které by neměly překročit 20 % průměrné hmotnosti u každého pohlaví.

1.3.2 Podmínky chovu a krmení

Teplota ve zkušební místnosti pro pokusná zvířata by měla být $(22 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Relativní vlhkost by měla být alespoň 30 %, neměla by však překročit 70 % během čištění místnosti a cílem je hodnota 50 – 60 %. Osvětlení by mělo být umělé, mělo by se střídát 12 h světla a 12 h tmy, není-li v chovné místnosti denní světlo. Ke krmení by se mělo používat obvyklé krmivo určené pro pokusná zvířata od registrovaného výrobce s neomezeným přísunem pitné vody. Výběr krmiva může být ovlivněn nutností zajistit vhodnou přísadu zkoušené látky, je-li látka podávána tímto způsobem.

Pokusná zvířata lze chovat jednotlivě, anebo je umístit v klecích v malých skupinkách pokusných zvířat stejného pohlaví. Páření by mělo probíhat v klecích, které jsou k tomuto účelu vhodné v souladu s příslušným právním předpisem¹⁰⁾, pokud není stanoveno projektem pokusů jinak. Po spáření je třeba umístit oplodněné samice individuálně do klecí určených k vrhu nebo chovu mláďat. Oplodněné potkany lze rovněž chovat v malých skupinách a oddělit jeden až dva dny před vrhem. Když se blíží doba vrhu, je nutné oplodněným pokusným zvířatům poskytnout vhodný a definovatelný materiál pro tvorbu hnízda.

1.3.3 Příprava pokusných zvířat

Pokusná zvířata jsou vybrána s ohledem na druh, pohlaví a stáří v souladu s ustanovením § 15 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾ a označena tak, aby byla možná identifikace jednotlivých pokusných zvířat. Dobu navykání stanoví § 10 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾. Pokusná zvířata se charakterizují podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti nebo stáří. K dispozici by měly být veškeré informace o sourozeneckých vztazích, aby se nepářili sourozenci. Pokusná zvířata se náhodným výběrem rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin (doporučuje se rozdělení podle tělesné hmotnosti). Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Každému pokusnému zvířeti se přiřadí jednoznačné identifikační číslo. U generace P se tato čísla přiřadí před zahájením podávání dávek. U generace F1 je nutné přidělit tato čísla po odstavení pokusných zvířat vybraných k páření. U všech vybraných pokusných zvířat generace F1 se vedou záznamy označující původ vrhu. Kromě toho se doporučuje individuální identifikace mláďat co nejdříve po narození, kdy se provádí individuální vážení mláďat nebo jakékoliv funkční zkoušky.

Na začátku podávání dávek musí být rodičovská (P) generace pokusných zvířat stará přibližně 5 až 9 týdnů. Je-li to možné, měla by mít pokusná zvířata ze všech zkušebních skupin stejnou hmotnost a věk.

1.4 POSTUP

1.4.1 Počet a pohlaví pokusných zvířat

Každá experimentální i kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet pokusných zvířat, aby bylo možné získat minimálně 20 březích samic s přibližně stejným termínem vrhu. To pravděpodobně nebude možné u látek, které vyvolávají nežádoucí účinky spojené s aplikací (např. sterilitu, nadměrnou toxicitu při vysoké dávce). Cílem je získat dostatečný počet březích samic, a tím zajistit významné hodnocení potenciálu dané látky ovlivnit plodnost, březost, chování samic a kojených mláďat, růst a vývoj potomstva generace F1 od doby početí až do doby dospělosti a vývoj jejich potomstva (F2) až do odstavení. Nepodaří-li se však dosáhnout požadovaného počtu březích pokusných zvířat (tj. 20), nemusí to nutně znamenat znehodnocení studie, a proto by hodnocení mělo vždy probíhat individuálně případ od případu.

1.4.2 Příprava dávek

Není-li jiný vhodnější způsob aplikace (např. kožní nebo inhalační), doporučuje se orální podávání zkoušené látky (v krmivu, pitné vodě nebo pomocí žaludeční sondy).

Zkoušená látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit použití vodného

roztoku/suspenze, poté použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku v jiném vehikulu. U jiného typu vehikula, než je voda, je třeba znát jeho toxikologické charakteristiky. Stanoví se stálost zkoušené látky v daném vehikulu.

1.4.3 **Dávkování**

Použijí se alespoň tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Není-li dávka limitována fyzikálně-chemickou podstatou nebo biologickými účinky zkoušené látky, zvolí se nejvyšší úroveň dávky tak, aby vyvolala toxicitu, ale nezpůsobila úhyn nebo silné bolesti. V případě neočekávané mortality jsou obvykle ještě přijatelné studie s úmrtností rodičovských (P) pokusných zvířat nižší než přibližně 10 %. Ve snaze prokázat jakoukoli reakci související s dávkováním a s hodnotou dávky bez pozorovatelného nepříznivého účinku (NOAEL) se zvolí sestupná posloupnost úrovní dávek. Pro nastavení sestupných úrovní dávek jsou obvykle optimální intervaly lišící se faktorem 2 až 4 a často je vhodnější přidání čtvrté zkušební skupiny než používání velkých intervalů mezi jednotlivými dávkami (např. lišících se faktorem 10). U studií by dávky krmiva neměly být více než trojnásobné. Při výběru úrovně dávek je třeba vzít v úvahu jakékoliv existující údaje o toxicitě, a to zvláště v případě výsledků studií po opakované dávce. Rovněž je třeba vzít v úvahu jakékoliv existující informace o metabolismu a kinetice zkoušené sloučeniny nebo příbuzných látek. Tyto informace navíc napomohou rovněž při prokazování přiměřenosti dávkovacího režimu.

Kontrolní skupina je neexponovaná skupina nebo kontrolní skupina s vehikulem, pokud se vehikulum pro aplikaci zkoušené látky používá. S výjimkou aplikace zkoušené látky je třeba s pokusnými zvířaty v kontrolní skupině zacházet naprosto stejným způsobem jako s pokusnými zvířaty v experimentální skupině. Používá-li se vehikulum, podá se kontrolní skupině v nejvyšším používaném objemu. Podává-li se zkoušená látka v krmivu a způsobuje-li snížený příjem nebo využití krmiva, pak je třeba zvážit nutnost použití párově krmené kontrolní skupiny. Jinak lze místo souběžné párově krmené kontrolní skupiny použít údaje získané z kontrolovaných studií určených k hodnocení účinků snížené spotřeby krmiva na reprodukční parametry.

Pozornost je třeba věnovat následujícím typickým znakům vehikula a jiných přísad: účinku na absorpci, distribuci, metabolismus, nebo retenci zkoušené látky, dále vlivu na chemické vlastnosti zkoušené látky, které mohou změnit její toxikologické vlastnosti, a vlivu na spotřebu krmiva, vody nebo nutriční stav pokusných zvířat.

1.4.4 **Limitní zkouška**

Pokud orální studie s jednou úrovní dávky v množství alespoň 1 000 mg /kg tělesné hmotnosti na den, nebo rovnocenné procento látky v krmivu nebo pitné vodě při aplikaci dávky v krmivu nebo pitné vodě pomocí postupů předepsaných pro tuto studii nevyvolá žádnou zjistitelnou toxicitu ani u rodičovských pokusných zvířat, ani u jejich potomstva a pokud se

neočekává ani toxicita na základě existujících údajů o strukturně/metabolicky příbuzných sloučeninách, pak není nutné uvažovat o kompletní studii využívající několika úrovní dávek. Limitní zkouška se použije, pokud expozice u člověka nevyžaduje použít vyšší úroveň orální dávky. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň expozice dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušené látky.

1.4.5 Aplikace dávek

Zkoušená látka se podává pokusným zvířatům 7 dnů v týdnu. Upřednostňuje se orální způsob podávání (v krmivu, pitné vodě nebo žaludeční sondou). Pokud se používá jiný způsob podávání, je třeba podat zdůvodnění a provést odpovídající modifikace. Všem pokusným zvířatům by měla být látka během odpovídajícího experimentálního období podávána stejným způsobem. Objem jednorázově podávané tekutiny by neměl překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti (0,4 ml/100 g tělesné hmotnosti je maximum pro kukuřičný olej), výjimkou jsou vodné roztoky, kde lze použít 2 ml/100 g tělesné hmotnosti.

S výjimkou dráždivých nebo žíravých látek, u kterých vyšší koncentrace obvykle vedou ke zhoršení účinků, by měla být variabilita objemu podávané dávky minimalizována úpravou koncentrací tak, aby bylo zajištěno, že podávaný objem bude stejný pro všechny dávky.

Ve studiích zaměřených na podávání látky žaludeční sondou budou mláďata dostávat zkoušenou látku obvykle nepřímo prostřednictvím mléka, dokud nezačne přímé dávkování po jejich odstavení. Ve studiích zaměřených na podávání látky v krmivu nebo pitné vodě budou mláďata navíc dostávat zkoušenou látku přímo, jakmile začnou během posledního týdne laktčního období sama žrát.

U látky podávané krmivem nebo pitnou vodou je velmi důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky neovlivňovalo normální rovnováhu živin nebo vody, nebránilo vyváženosti běžného krmiva nebo vody. Je-li zkoušená látka podávána v krmivu, je třeba používat buď konstantní koncentrace (ppm) v krmivu, nebo konstantní úroveň dávky ve vztahu k tělesné hmotnosti pokusného zvířete. Použití jiného způsobu je třeba zdůvodnit. Látka podávaná žaludeční sondou se podává každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně se přizpůsobí tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti pokusného zvířete. Při přizpůsobování dávky podle hmotnosti u podávání látky sondou je třeba vzít v úvahu informace týkající se placentární distribuce.

1.4.6 Uspořádání pokusů

S každodenním podáváním zkoušené látky se u rodičovské generace (P) samců a samic zahájí od 5. do 9. týdne věku. Denní podávání látky u samců a samic generace F1 je třeba zahájit po jejich odstavení; stále je třeba mít na paměti, že v případě, kdy se zkoušená látka podává prostřednictvím krmiva nebo pitné vody, může docházet k přímé expozici

mláďat F1 zkoušené látky již během laktačního období. U obou pohlaví (P i F1) by se mělo s podáváním látky pokračovat alespoň 10 týdnů před obdobím páření. S dávkováním se u obou pohlaví pokračuje i během dvoutýdenního období páření. Nejsou-li samci již nezbytní k hodnocení reprodukčních účinků, měli by být humánním způsobem usmrceni a vyšetřeni. U rodičovské generace (P) samic dávkování pokračuje i během březosti a až do odstavení potomstva generace F1. Pozornost je nutno věnovat modifikacím dávkovacího programu na základě dostupných informací o zkoušené látce, včetně existujících údajů o toxicitě, indukci metabolismu nebo bioakumulaci. Obvykle by dávka pro jednotlivá pokusná zvířata měla vycházet z aktuální zjištěné tělesné hmotnosti. Velkou pozornost je však třeba věnovat úpravě dávek během posledního trimestru březosti.

Podávání látky samcům a samicím generací P a F1 pokračuje až do doby jejich utracení. Všichni dospělí samci a samice generace P a F1 se humánním způsobem utratí, pokud již nejsou nezbytní k hodnocení reprodukčních účinků. Potomstvo generace F1, které není vybráno k páření, a celé potomstvo generace F2 se po odstavení humánním způsobem utratí.

1.4.7 **Páření**

1.4.7.1 *Připouštění rodičovské generace (P)*

U každého páření se každá samice umístí s jedním samcem se stejnou úrovní dávek (párování 1:1), dokud nedojde ke spáření, nebo po dobu alespoň 2 týdnů. Každý den se samice vyšetří na přítomnost spermatu nebo vaginální zátky. Nultým dnem březosti je den, kdy je pozorována vaginální zátka nebo spermie. V případě, že je spáření neúspěšné, se zváží spáření se samci s osvědčenou plodností ze stejné skupiny. Spárené páry se v záznamech jasně označí. Je třeba se vyvarovat páření sourozenců.

1.4.7.2 *Páření generace F1*

U páření pokusných zvířat generace F1 se za účelem produkce generace F2 po odstavení vybere z každého vrhu alespoň jeden samec a samice pro spáření s jinými pokusnými zvířaty ze stejné dávkové skupiny, ale z odlišného vrhu. Výběr pokusných zvířat z každého vrhu se provede náhodně, pokud nejsou mezi pokusnými zvířaty z daného vrhu pozorovány žádné výrazné odlišnosti v tělesné hmotnosti nebo vzhledu. V případě zjištěných odlišností se z každého vrhu vyberou nejvyšší jedinci. Logicky by bylo nejlepší tento výběr provádět na základě tělesné hmotnosti, ale vhodnější se může jevit výběr na základě vzhledu. Potomstvo generace F1 by se nemělo připouštět před dosažením plné pohlavní zralosti.

Páry, u kterých nedojde k oplodnění, je třeba vyšetřit za účelem zjištění příčiny neplodnosti. Tento postup může zahrnovat umožnění další příležitosti k oplodnění s pokusným zvířetem s osvědčenou plodností,

mikroskopické vyšetření reprodukčních orgánů anebo vyšetření estrálního cyklu a spermatogeneze.

1.4.7.3 *Druhé páření*

V určitých případech, jako např. u odchylek velikosti vrhu spojených s aplikací nebo při zjištění nejednoznačného účinku po prvním páření, se doporučuje opětovné připuštění dospělých pokusných zvířat z generace P a F1 za účelem produkce druhého vrhu. Rovněž se doporučuje znovu připustit samice nebo samce, u kterých nedošlo k produkci mláďat s osvědčenými pokusnými zvířaty. Pokud je u jakékoliv generace nezbytná produkce druhého vrhu, měla by být pokusná zvířata opakovaně připuštěna přibližně jeden týden po odstavení posledního vrhu.

1.4.7.4 *Velikost vrhu*

Pokusným zvířatům se ponechá možnost normálně vrhnout a pečovat o svoje potomstvo až do jeho odstavení. Standardizace velikosti vrhů je dobrovolná. Pokud se standardizace provádí, je nutné používanou metodu detailně popsat.

1.5 POZOROVÁNÍ

1.5.1 **Klinická pozorování**

Všeobecné klinické pozorování se provádí denně a v případě podávání látky žaludeční sondou časový rozvrh zohlední očekávané doby nejvyšších účinků po podání látky. Zaznamenají se významné změny chování, známky ztíženého nebo prodlužovaného vrhu a všechny příznaky toxicity. Alespoň jednou týdně se u každého pokusného zvířete provede další podrobnější vyšetření, které je nejlepší provádět v době vážení pokusného zvířete. Je-li to možné, provádí se dvakrát denně, během víkendu případně jednou denně, u všech pokusných zvířat pozorování z důvodu morbidity a mortality.

1.5.2 **Tělesná hmotnost a spotřeba krmiva/vody u rodičovských pokusných zvířat**

Rodičovská pokusná zvířata (generace P a F1) se zváží v první den podávání látky a poté alespoň jednou týdně. Samice rodičovské generace (P a F1) se zváží 0., 7., 14. a 20. nebo 21. den gestace, během stejných dnů v průběhu laktace při vážení vrhů a poté v den utracení pokusných zvířat. Tato pozorování se zaznamenají individuálně u každého dospělého pokusného zvířete. V období před pářením a během gestačního období se spotřeba krmiva měří minimálně každý týden. Pokud se látka podává ve vodě, měří se spotřeba vody alespoň jednou týdně.

1.5.3 **Estrální cyklus**

Před pářením a popřípadě i během páření se u samic generace P a F1 hodnotí délka a normalnost estrálního cyklu pomocí vaginálních stěrů, dokud se nezíská důkaz o zabřeznutí. Při získávání

vaginálních/cervikálních buněk je třeba neporušit sliznice a následně také nevyvolat stav falešné březosti^{7a)}.

1.5.4 Parametry spermatu

U všech samců generace P a F1 se po utracení zaznamená hmotnost varlat a nadvarlat a jeden z každého orgánu se ponechá pro histopatologické vyšetření (viz část 1.5.7, 1.5.8.1). Zbylá varlata a nadvarlata z podskupiny alespoň deseti samců z každé generace P a F1 se použijí pro výpočet homogenizačně odolných spermatid a kaudálních epididymálních rezerv spermií. Od stejné podskupiny samců se shromáždí spermie z kaudálních částí nadvarlat nebo spermie z chámovodů za účelem vyhodnocení jejich motility a morfologie. Pokud se zjistí účinky spojené s aplikací látky anebo jsou z jiných studií k dispozici důkazy o možném účinku na spermatogenezi, provede se hodnocení spermatu u všech samců z každé skupiny podle dávky; jinak se výpočet omezí pouze na samce z kontrolní skupiny a ze skupiny generace P a F1 s vysokou dávkou.

Vypočítá se celkový počet homogenizačně odolných testikulárních spermatid a spermií z kaudální části nadvarlat^{7a)}. Kaudální rezervy spermií lze odvodit z koncentrace a objemu spermií v suspenzi používané k doplnění kvalitativních hodnocení a počtu spermií získaných pomocí následného rozřezání nebo homogenizování zbylé kaudální tkáně. Pokud nejsou zhotoveny digitální záznamy nebo videozáznamy anebo nejsou-li vzorky zmrazeny a analýza provedena později, je nutné výpočet u vybrané podskupiny samců ze všech dávkových skupin provést okamžitě po utracení pokusných zvířat. V těchto případech se nejprve provádí analýza u kontrolní skupiny a u skupiny s vysokou dávkou. Pokud se nezjistí žádné účinky spojené s aplikací (např. vliv na počet, motilitu nebo morfologii spermií), není nutné provádět analýzu u ostatních dávkových skupin. Pokud se zjistí účinky spojené s aplikací u skupiny s vysokou dávkou, je nutné zhodnotit i skupiny s nižšími dávkami.

Motilita epididymálních spermií (nebo spermií z chámovodů) se vyhodnotí nebo zaznamená na video okamžitě po utracení. Spermie se odeberou tak, aby došlo k minimálnímu poškození, a pomocí vhodných metod se zředí pro analýzu motility^{7a)}. Procento progresivně pohyblivých spermií se stanoví subjektivně, nebo objektivně. Pokud se provádí počítačová analýza pohyblivosti^{7a)}, spočívá odvození progresivní motility v mezních uživatelsky nastavených hodnotách průměrné rychlosti dráhy a přímosti nebo lineárního koeficientu. Pokud se pořídí videozáznam vzorků^{7a)} anebo jsou zobrazení během pitvy zaznamenána jiným způsobem, stačí provést následnou analýzu pouze u kontrolní skupiny a u skupiny s vysokou dávkou u samců z generací P a F1, pokud nedojde ke zjištění účinků spojených s aplikací. V takovém případě je nutné vyhodnotit rovněž skupiny s nižší úrovní dávek. Pokud nejsou k dispozici žádné digitální záznamy ani videozáznam, analyzují se pitvou všechny vzorky od všech experimentálních skupin.

Provede se morfologické hodnocení vzorků epididymálních spermií (nebo spermií z chámovodů). Spermie (minimálně 200 na vzorek) se vyšetří jako

stabilní, mokré preparáty^{7a)} a klasifikují se jako normální nebo abnormální. Příklady morfologických odchylek spermii by měly zahrnovat syntézu, izolované a zdeformované hlavičky nebo ocásky. Hodnocení se provádí u vybraných podskupin samců ze všech skupin podle úrovně dávek bezprostředně po utracení pokusných zvířat, nebo později na základě digitálních záznamů nebo videozáznamů. Jsou-li stěry zakonzervované, lze je rovněž vyhodnotit později. V takovém případě se analyzuje nejprve kontrolní skupina a skupiny s vysokou dávkou. Pokud se nezjistí žádné účinky spojené s aplikací (např. účinek na morfologii spermii), není nutné analyzovat ostatní dávkové skupiny. Pokud se zjistí účinky spojené s aplikací u skupiny s vysokou dávkou, pak je nutné zhodnotit i skupiny s nižšími dávkami.

Pokud již byla kterákoliv výše zmíněná hodnocení parametrů spermii zkoumána v rámci nejméně 90 dnů trvající studie systémové toxicity, pak není nutné je v rámci dvougenerační studie opakovat. Doporučuje se však veškeré vzorky nebo digitální záznamy spermii z generace P uchovat pro pozdější hodnocení.

1.5.5 **Potomstvo**

Všechny vrhy se vyšetří co nejdříve po vrhu (v nultý den laktace), aby bylo možné stanovit počet a pohlaví mlád'at, počet mrtvě a živě narozených mlád'at a přítomnost nápadných anomálií. Mlád'ata, která byla nalezena mrtvá v den 0, se vyšetří na možné defekty a příčinu smrti (nejsou-li rozložená) a posléze se uchovají. Živá mlád'ata se spočítají a individuálně zváží ihned po narození (v nultý den laktace) nebo během 1. dne a poté se váží v pravidelných intervalech, např. v 4., 7., 14., a 21. den laktace. Zaznamenají se fyzické nebo behaviorální abnormality zjištěné u samic nebo jejich potomstva.

Fyzický vývoj u potomstva se zaznamenává hlavně podle přírůstku tělesné hmotnosti. Další fyzické parametry (např. otevření uší a očí, prořezávání zubů, růst srsti) mohou poskytnout doplňkové informace, ale u těchto údajů se dává přednost hodnocení v rámci kontextu údajů o pohlavní zralosti (např. stáří a tělesná hmotnost při vaginálním otevření nebo odpojení předkožky)^{7a)}. Doporučuje se provést funkční vyšetření (např. pohybová aktivita, smyslové funkce, reflexní ontogeneze) potomstva generace F1 před nebo po odstavení, a to zvláště vyšetření týkající se pohlavní zralosti, nejsou-li taková vyšetření součástí samostatných studií. U odstavených potomků generace F1 vybraných k připuštění je třeba stanovit stáří, ve kterém došlo k vaginálnímu otevření a odloučení předkožky. U mlád'at generace F2 je třeba změřit anogenitální vzdálenost během postnatálního dne 0, je-li vyvolána změnami v poměru pohlaví u generace F1 nebo načasováním pohlavní zralosti.

Funkční sledování lze vynechat u skupin, které jinak vykazují jasné známky nepříznivých účinků (např. významné snížení přírůstku hmotnosti atd.). Pokud se provádí funkční vyšetření, nemělo by se provádět u mlád'at vybraných k páření.

1.5.6 Celková pitva

Po utracení nebo uhynutí během studie se všechna pokusná zvířata rodičovské generace (P a F1), všechna mláďata se zevními odchylkami nebo klinickými známkami a rovněž jedno náhodně vybrané mládě z každého pohlaví a vrhu z obou generací F1 a F2 makroskopicky vyšetří na jakékoliv strukturální abnormality anebo patologické změny. Speciální pozornost je třeba věnovat orgánům rozmnožovací soustavy. U mláďat, která jsou humánním způsobem utracena ve stavu agónie, a u mrtvých mláďat, která nejsou rozložena, se provede vyšetření za účelem zjištění možných defektů nebo příčiny uhynutí. Mláďata se uchovají.

Dělohy všech samic prvorodiček se vyšetří na přítomnost a počet zachycených vajíček v děloze.

1.5.7 Hmotnost orgánů

V okamžiku utracení se u všech rodičovských pokusných zvířat generace P a F1 stanoví tělesná hmotnost a hmotnost těchto orgánů (párové orgány je třeba vážit jednotlivě):

- děloha, vaječníky,
- varlata, nadvarlata (celkem a kaudální),
- prostata,
- semenné vázky s koagulačními žlázami a jejich tekutinami a s prostatou (jako jedna jednotka),
- mozek, játra, ledviny, slezina, hypofýza, štítná žláza a nadledvinky a známé cílové orgány.

U mláďat generace F1 a F2 vybraných k pitvě se stanoví tělesná hmotnost v okamžiku utracení. U jednoho náhodně vybraného mláděte z každého pohlaví a vrhu (viz část 1.5.6) se zváží tyto orgány: mozek, slezina a brzlík.

Je-li to proveditelné, zhodnotí se výsledky celkové pitvy a hmotnosti orgánů v souvislost s výsledky zjištěnými v jiných studiích opakovaného dávkování.

1.5.8 Histopatologie

1.5.8.1 Rodičovská pokusná zvířata

Pro histopatologické vyšetření se připraví a ve vhodném prostředí uchovají tyto orgány a tkáně rodičovských pokusných zvířat (P a F1) nebo jejich reprezentativní vzorky:

- pochva, děloha s děložním hrdlem a vaječníky (uložené ve vhodném konzervačním prostředku),

- jedno varle (uložené v Bouinově roztoku nebo jiném srovnatelném prostředí), jedno nadvarle, semenné vajíčky, prostata a koagulační žláza,
- již dříve určený cílový orgán nebo orgány od všech pokusných zvířat generace P a F1 vybraných k páření.

U všech pokusných zvířat generace P a F1 ze skupiny s vysokou dávkou a z kontrolní skupiny vybraných k páření se provede kompletní histopatologické vyšetření všech výše vyjmenovaných uchovaných orgánů a tkání. Vyšetření vaječnicků u pokusných zvířat generace P není povinné. Provede se rovněž vyšetření orgánů vykazujících změny spojené s aplikací látky u pokusných zvířat ze skupiny s nízkou a střední dávkou, které mohou napomoci stanovit dávku NOAEL. Histopatologické vyšetření se navíc provede u reprodukčních orgánů pokusných zvířat ze skupiny s nízkou a střední dávkou, u kterých je podezření na sníženou plodnost, např. u těch, u kterých nedošlo k páření, zabřeznutí, oplodnění nebo k vrhu zdravého potomstva nebo u kterých byl ovlivněn estrální cyklus nebo počet, motilita nebo morfologie spermií. Vyšetří se všechny makroskopické léze, jako např. atrofie nebo tumory.

Za účelem zjištění účinků spojených s aplikací, jako jsou např. nevyvinuté spermatidy, chybějící vrstva nebo typ zárodečných buněk, mnohojaderné obří buňky nebo rozrušení spermatických buněk v dutině, se provede podrobné histopatologické vyšetření varlat (např. pomocí Bouinova roztoku, zalití do parafínu a příčných řezů o tloušťce 4 – 5 μm)^{7a)}. Vyšetření intaktního nadvarlete by mělo zahrnovat vyšetření hlavy, těla a kaudální části, čehož lze dosáhnout vyhodnocením podélného řezu. U nadvarlete se vyšetří leukocytová infiltrace, změna v prevalenci typů buněk, aberantní typy buněk a fagocytóza spermií. K vyšetření samčí rozmnožovací soustavy lze použít PAS a dobarvení hematoxylinem.

Postlaktační vaječník by měl obsahovat původní a rostoucí folikuly a rovněž zvětšená žlutá tělíška z období laktace. Histopatologické vyšetření by mělo odhalit kvalitativní snížení celkového počtu původních folikulů. U samic generace F1 se provede kvantitativní vyhodnocení původních folikulů. K vyhodnocení použitého postupu je nutné mít statisticky odpovídající počet pokusných zvířat, výběr řezů vaječnicků a velikost vzorků řezů. S cílem umožnit srovnání vaječnicků u testované a kontrolní skupiny by mělo vyšetření zahrnovat výpočet počtu původních folikulů, které lze zkombinovat s malými rostoucími folikuly^{7a)}.

1.5.8.2 *Odstavená mláďata*

Pro histopatologické vyšetření se ve vhodném prostředí připraví a uchová makroskopicky abnormální tkáň a cílové orgány od všech mláďat se zevními odchylkami nebo klinickými příznaky a rovněž od jednoho náhodně vybraného mláděte z každého pohlaví a vrhu z obou generací F1 a F2, které nebyly vybrány k páření. Kompletní histopatologická charakterizace uchovaných tkání se provede se speciálním důrazem na orgány rozmnožovací soustavy.

2 DATA

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky se zaznamenávají individuálně a shrnou se do tabulek tak, aby byl u každé experimentální skupiny a každé generace uveden počet pokusných zvířat na začátku zkoušky, počet pokusných zvířat uhynulých během zkoušky nebo utracených z humanitních důvodů, doba úhynu nebo humanitního utracení, počet plodných samic, počet březích samic, počet pokusných zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis pozorovaných příznaků toxicity včetně doby nástupu, trvání a závažnosti veškerých toxických účinků, typy pozorování rodičovských pokusných zvířat a jejich potomstva a všechny důležité údaje o vrhu.

Numerické výsledky se vyhodnotí pomocí vhodné, všeobecně uznávané statistické metody; metody se zvolí jako součást návrhu studie a je třeba je zdůvodnit. Pro analýzu dat je vhodné použít statistické modely dávka-odezva. Protokol by měl obsahovat dostatečné informace o použité metodě analýzy a počítačovém programu, aby mohl tuto analýzu znovu vyhodnotit a rekonstruovat nezávislý recenzent/statistik.

2.2 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky této dvougenerační studie reprodukční toxicity se vyhodnotí ve vztahu k pozorovaným účinkům včetně pitvy a mikroskopických nálezů. V hodnocení musí být uvedeno, zda existuje nebo neexistuje souvislost mezi dávkou zkoušené látky a přítomností nebo nepřítomností, výskytem a závažností abnormalit včetně makroskopických lézí stanovených cílových orgánů, vlivu na plodnost, klinických abnormalit, vlivu na reprodukční výkonnost a schopnost vrhu, změny tělesné hmotnosti, vlivu na mortalitu a další toxické účinky. Při hodnocení výsledků zkoušky se přihlédně k fyzikálně-chemickým vlastnostem zkoušené látky a toxikokinetickým údajům, jsou-li k dispozici.

Správně provedená zkouška reprodukční toxicity by měla zajistit dostačující odhad úrovně dávky bez účinku a vysvětlení nepříznivých účinků na reprodukci, vrh, laktaci, postnatální vývoj včetně růstu a pohlavního vývoje.

2.3 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Dvougenerační studie reprodukční toxicity poskytne informace o účinku opakované expozice látce během všech fází reprodukčního cyklu. Studie zejména poskytne informace o reprodukčních parametrech a o vývoji, růstu, dozrávání a přežívání potomstva. Výsledky studie se interpretují v souvislosti s výsledky ze subchronických, reprodukčních, toxikokinetických a dalších studií. Výsledky této studie lze použít k posouzení potřeby dalšího zkoušení chemické látky. Extrapolace výsledků této studie na člověka platí pouze v omezené míře. Největší význam těchto výsledků spočívá v tom, že poskytují informace o úrovni dávky bez účinků a o přípustné expozici člověka^{7a)}.

3 **PROJEKT POKUSU, PROTOKOL POKUSU A ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA**

V souladu s příslušnými právními předpisy^{9),10)} musí být zpracován projekt pokusu a o průběhu pokusu je nutno vést protokol.

3.1 Zpráva o průběhu pokusu obsahuje tyto informace:

Zkoušená látka:

- fyzikální vlastnosti a popřípadě fyzikálně-chemické vlastnosti,
- údaje o identitě,
- čistota.

Vehikulum (v případě potřeby):

- zdůvodnění výběru jiného vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

- použitý druh a kmen,
- počet, stáří a pohlaví pokusných zvířat,
- původ, podmínky chovu, krmivo, materiál na výrobu hnízda atd.,
- hmotnost jednotlivých pokusných zvířat na začátku zkoušky.

Experimentální podmínky:

- zdůvodnění výběru úrovně látky,
- podrobné údaje o složení zkoušené látky/krmiva, o dosažené koncentraci,
- stálost a homogenita prostředku,
- podrobné údaje o podávání zkoušené látky,
- v případě potřeby přepočet koncentrace zkoušené látky (ppm) v krmivu/pitné vodě na skutečnou dávku (mg/kg tělesné hmotnosti na den), je-li to možné,
- podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody.

Výsledky:

- spotřeba krmiva a vody, jsou-li k dispozici, využití krmiva (přírůstek tělesné hmotnosti na gram spotřebovaného krmiva) a spotřeba zkoušené látky u pokusných zvířat generace P a F1

s výjimkou období kohabitace a minimálně poslední třetiny laktace,

- údaje o absorpci (jsou-li k dispozici),
- údaje o tělesné hmotnosti pokusných zvířat z generace P a F1 vybraných k páření,
- údaje o hmotnosti vrhu a mlád'at,
- tělesná hmotnost při utracení a údaje o absolutní a relativní hmotnosti u rodičovských pokusných zvířat,
- povaha, závažnost a trvání (doba nástupu a následný průběh) podrobných klinických pozorování (vratných i nevratných změn),
- den úhynu během studie nebo údaj, že pokusná zvířata přežila až do dne utracení,
- údaje o toxické reakci podle pohlaví a dávky, včetně koeficientů páření, plodnosti, gestace, porodnosti, životaschopnosti a laktace; zpráva by měla uvádět údaje využitě při výpočtu těchto koeficientů,
- toxické nebo jiné účinky na reprodukci, potomstvo, postnatální růst atd.,
- pitevnické nálezy,
- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- počet samic s normálním cyklem z generace P a F1 a délka cyklu,
- celkový počet kaudálních epididymálních spermií, procento progresivně pohyblivých spermií, procento morfologicky normálních spermií a procento spermií se všemi identifikovanými abnormalitami,
- doba do páření včetně počtu dnů před pářením,
- délka gestace,
- počet implantátů, žlutých tělísek, velikost vrhu,
- počet živě narozených mlád'at a postimplantačních ztrát,
- počet mlád'at s makroskopicky viditelnými abnormalitami a počet zakrslých mlád'at, pokud byl zjišťován,

- údaje o fyzických vývojových znacích u mláďat a další údaje o postnatálním vývoji; hodnocené fyzické vývojové znaky je nutno zdůvodnit,
- popřípadě údaje o funkčním pozorování mláďat a dospělých pokusných zvířat,
- statistické vyhodnocení výsledků, je-li to možné.

Diskuse a interpretace výsledků.

Závěry včetně hodnot NOAEL pro účinky na samice a potomstvo.“

12. V příloze č. 2 se za metodu B.41 FOTOTOXICITA – TEST FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO* doplňují nové metody B.42 a B.43, které znějí:

„B.42 SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN

1 METODA je v souladu s právem Evropských společenství^{7a)}.

1.1 ÚVOD

Zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin (LLNA) byla dostatečně validována a uznána, což opravňuje její přijetí jako nové metody^{7a)}. Jedná se o druhou metodu zkoušení na pokusných zvířatech zaměřenou na hodnocení potenciálu chemických látek senzibilizovat kůži. První metoda (B.6) využívá zkoušek na morčatech, a to zvláště maximalizační zkoušku na morčatech a Bühlerův test^{7a)}.

LLNA poskytuje alternativní postup pro identifikaci chemických látek způsobujících senzibilizaci kůže a pro potvrzení, že chemické látky nemají významný potenciál senzibilizovat kůži. To však neznamená, že by se metoda LLNA měla ve všech případech používat namísto zkoušek na morčatech; znamená to spíše, že tato metoda má stejnou hodnotu a že ji lze použít jako alternativní metodu, jejíž pozitivní ani negativní výsledky již nevyžadují žádné další potvrzování.

LLNA poskytuje určité výhody, pokud jde o vědecký pokrok a dobré životní podmínky pokusných zvířat. Metoda zkoumá indukční fázi senzibilizace kůže a poskytuje kvantitativní údaje, které jsou vhodné pro hodnocení vztahu dávky a odezvy. Podrobné údaje o validaci metody LLNA a přehled prací spojených s touto metodou byly publikovány^{7a)}.

Kromě toho je třeba poznamenat, že mírně nebo středně silně senzibilizující látky, které se doporučují jako vhodné pozitivní kontrolní látky u zkoušek na morčatech, jsou vhodné také pro metodu LLNA^{7a)}.

LLNA je metodou *in vivo* a jako taková neeliminuje používání pokusných zvířat při hodnocení senzibilizující aktivity působící kontaktem. Tato metoda však umožňuje snížit počet pokusných zvířat, která jsou k tomuto účelu nezbytná. Kromě toho LLNA nabízí podstatné zjemnění způsobu, jakým se pokusná zvířata používají ke zkoušení kontaktní senzibilizace. Metoda LLNA je založená na posouzení imunologických jevů navozených chemickými látkami během indukční fáze senzibilizace. Na rozdíl od zkoušek na morčatech metoda LLNA nevyžaduje vyvolávání kožní přecitlivělosti navozené provokační reakcí. Kromě toho metoda LLNA nevyžaduje ani používání adjuvantu, jak je tomu v případě maximalizační zkoušky na morčatech. Díky tomu metoda LLNA snižuje utrpení pokusných zvířat. Ale i přes výhody, které má metoda LLNA ve srovnání s tradičními maximalizačními zkouškami na morčatech, je třeba si uvědomit, že zde existují určitá omezení, která si mohou vyžádat použití tradičních zkoušek na morčatech (např. falešně negativní výsledky při použití LLNA s určitými kovy, falešně pozitivní výsledky u určitých látek způsobujících podráždění kůže)^{7a)}.

1.2 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Základní princip metody LLNA spočívá v tom, že senzibilizátory navozují primární proliferaci lymfocytů v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace chemické látky. Toto zmnožení je úměrné aplikované dávce (a potenciálu alergenu) a poskytuje jednoduchý prostředek pro získání objektivního, kvantitativního měření senzibilizace. LLNA hodnotí tuto proliferaci jako vztah dávka-odezva a za tímto účelem se porovnává proliferace ve zkušebních skupinách s proliferací u skupin, kterým se podává vehikulum. Poměr proliferace u exponovaných skupin a u skupin s vehikulem, nazvaný index stimulace, musí být alespoň 3, než lze zkoušenou látku dále hodnotit jako možný senzibilizátor kůže. Metody, které jsou zde popsány, jsou založené na používání radioaktivního značení pro měření proliferace buněk. Pro hodnocení této proliferace je však možné použít i další koncová vyhodnocení, a to za předpokladu, že jsou zdůvodněná a existují pro ně vhodné vědecké důkazy, včetně úplných citací a popisu metodiky.

1.3 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.3.1 Přípravy

1.3.1.1 Podmínky chovu a krmení

Pokusná zvířata se chovají odděleně. Teplota ve zkušební místnosti pro pokusná zvířata by měla být $(22 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Ačkoliv by relativní vlhkost měla být alespoň 30 % a neměla by s výjimkou čištění místnosti překročit

70 %, je cílem hodnota 50 – 60 %. Osvětlení by mělo být umělé, mělo by se střídat 12 h světla a 12 h tmy, není-li v chovné místnosti denní světlo. Ke krmení lze použít obvyklé krmivo určené pro pokusná zvířata od registrovaného výrobce s neomezenou dodávkou pitné vody. Pokusná zvířata mohou být chována v klecích ve skupinách podle dávky v souladu s příslušným právním předpisem¹⁰⁾, pokud není stanoveno projektem pokusů jinak, ale počet pokusných zvířat v kleci nesmí bránit nerušenému pozorování každého pokusného zvířete.

1.3.1.2 *Příprava pokusných zvířat*

Pokusná zvířata jsou vybrána s ohledem na druh, pohlaví a stáří v souladu s ustanovením § 15 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾ a označena tak, aby byla možná identifikace jednotlivých pokusných zvířat. Dobu navykání stanoví § 10 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾. Před začátkem aplikace látky se všechna pokusná zvířata vyšetří, aby se ověřilo, že nemají žádné pozorovatelné kožní léze.

1.3.2 **Zkušební podmínky**

1.3.2.1 *Pokusná zvířata*

Druhem zvoleným pro tuto zkoušku je myš. Používají se mladé dospělé samice myši z kmene CBA/Ca nebo CBA/J, které musí být nullipary a nesmějí být březí. Na začátku podávání dávek by pokusná zvířata měla být přibližně 8 až 12 týdnů stará a odchylky v hmotnosti pokusných zvířat by měly být pouze minimální a neměly by překročit 20 % průměrné hmotnosti. Ostatní kmeny a samci by se měli používat pouze tehdy, je-li k dispozici dostatek údajů, které by dokazovaly, že v rámci reakcí v metodě LLNA skutečně neexistují žádné specifické odlišnosti mezi kmeny nebo pohlavími.

1.3.2.2 *Kontrola spolehlivosti*

Pozitivní kontroly se používají k prokázání odpovídající účinnosti zkoušky a odborné způsobilosti laboratoře úspěšně provést zkoušky. Pozitivní kontrola by měla vyvolat pozitivní reakci v LLNA při úrovni expozice, u které se očekává zvýšení indexu stimulace (SI) > 3 ve srovnání s negativní kontrolní skupinou. Je třeba zvolit takovou pozitivní kontrolní dávku, aby reakce byla zřetelná, nikoliv však přehnaná. K preferovaným látkám patří 2-benzylidenoktanal (CAS 101-86-0, EINECS 202-983-3) a 2-sulfanylbenzothiazol (CAS 149-30-4, EINECS 205-736-8). Mohou existovat určité okolnosti, za niž lze při řádném zdůvodnění použít jiné kontrolní látky, které splňují výše uvedená kritéria. I když se pro každou zkoušku obvykle vyžaduje pozitivní kontrolní skupina, mohou se rovněž vyskytnout situace, kdy mají zkušební laboratoře k dispozici předchozí údaje o pozitivní kontrole prokazující homogenitu dostatečné reakce během šesti měsíců nebo delšího časového období. V takovém případě může být vhodnější méně časté testování s pozitivními kontrolami v intervalech, které by neměly být delší než 6 měsíců. Ačkoliv by se pozitivní kontrolní látky měly testovat ve

vehikulu, o kterém je známo, že vyvolává trvale stejnou reakci (např. aceton, olivový olej), mohou nastat určité situace, kdy je z důvodů požadovaných v právních předpisech nezbytné provést zkoušku s použitím nestandardního vehikula (klinicky/chemicky relevantní receptura přípravku). V takovém případě je třeba testovat možnou interakci pozitivní kontroly s tímto nestandardním vehikulem.

1.3.2.3 *Počet pokusných zvířat, úrovně dávek a výběr vehikula*

Na každou dávkovou skupinu se použijí alespoň čtyři pokusná zvířata, přičemž se použijí minimálně tři koncentrace zkoušené látky, dále se použije negativní kontrolní skupina, které se podává pouze vehikulum zkoušené látky, a v případě potřeby pozitivní kontrola. Jestliže se shromažďují údaje o jednotlivých pokusných zvířatech, použije se na každou dávkovou skupinu minimálně pět pokusných zvířat. S výjimkou aplikace zkoušené látky se s pokusnými zvířaty v kontrolní skupině zachází naprosto stejným způsobem jako s pokusnými zvířaty v experimentální skupině.

Volba dávkování a vehikula by měla být založena na doporučeních uvedených v literatuře^{7a)}. Dávky se vybírají z řady koncentrací 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atd. Při výběru tří po sobě jdoucích koncentrací je třeba zvážit již existující údaje o akutní toxicitě a kožní dráždivosti, jsou-li k dispozici, aby nejvyšší koncentrace maximalizovala expozici, ale aby současně nevyvolala systémovou toxicitu a nadměrné podráždění kůže^{7a)}.

Vehikulum by mělo být vybráno tak, aby se maximalizovaly zkušební koncentrace a rozpustnost k přípravě roztoku/suspenze vhodné pro aplikaci zkoušené látky. Upřednostňují se vehikula v následujícím pořadí: aceton/olivový olej (4:1 obj.), *N,N*-dimethylformamid, ethylmethylketon, propan-1,2-diol a dimethylsulfoxid^{7a)}, avšak mohou být použita i jiná vehikula, jsou-li předloženy dostatečné vědecké důvody. V určitých případech může být nezbytné použít jako doplňující kontrolu klinicky relevantní rozpouštědlo nebo komerční recepturu přípravku, v němž je zkoušená látka uváděna na trh. Zvláštní pozornost je třeba věnovat zajištění toho, aby byly hydrofilní materiály zapracovány do takového vehikula, které zvlhčí kůži a nesteče ihned z pokožky. Z tohoto důvodu není vhodné používat jako vehikulum pouze vodu.

1.3.3 **Zkušební postup**

1.3.3.1 *Harmonogram zkoušky*

Harmonogram zkoušky je následující:

- *Den 1:*

Každé pokusné zvíře se individuálně zváží a zaznamená se jeho hmotnost. Provede se otevřená aplikace 25 μ l příslušného ředění

zkoušené látky, samotného vehikula nebo pozitivní kontrolní látky (podle vhodnosti) na dorsální část obou uší.

- *Den 2 a 3:*

Zopakuje se postup aplikace provedený v den 1.

- *Den 4 a 5:*

Žádná aplikace.

- *Den 6:*

Zaznamená se hmotnost každého pokusného zvířete. Přes ocasní žílu se všem pokusným i kontrolním myším vpíchne 250 μl fyziologického roztoku ve fosfátovém pufru (PBS), obsahujícího 20 μCi ($7,4 \cdot 10^5$ Bq) [^3H]thymidinu (tritiovaném na metyly), nebo lze všem myším přes ocasní žílu vpíchnout 250 μl PBS obsahujícího 2 μCi ($7,4 \cdot 10^4$ Bq) [^{125}I]joddeoxyuridinu a 10^{-5} M fluordeoxyuridinu.

O pět hodin později se myši usmrtí. Drenující aurikulární lymfatické uzliny z obou uší se vyjmou a shromáždí se v PBS společně pro celou zkušební skupinu (metoda sdružení exponované skupiny), nebo se od každého pokusného zvířete vyjme pár lymfatických uzlin a uloží se do PBS individuálně pro každé pokusné zvíře (metoda individuálního přístupu k pokusným zvířatům)^{7a}.

1.3.3.2 *Příprava buněčné suspenze*

Jedna společná buněčná suspenze s buňkami lymfatických uzlin (LNC) buď od celé exponované skupiny, nebo bilaterálně od jednotlivých pokusných zvířat se připraví pomocí jemné mechanické deagregace přes 200 μm sítko z korozivzdorné oceli. Lymfatické buňky se dvakrát propláchnou v dostatečném množství PBS a nechají se vysrážet v roztoku s 5 % trichloroctovou kyselinou (TCA) při 4 °C po dobu 18 h^{7a}. Sediment se buď resuspenduje v 1 ml TCA a přemístí do scintilačních kyvet obsahujících 10 ml kapalného scintilátoru pro měření aktivity ^3H , nebo se přenese přímo do zkumavek pro měření aktivity ^{125}I .

1.3.3.3 *Stanovení buněčné proliferace (inkorporované radioaktivity)*

Inkorporace [^3H]thymidinu se měří β -scintilační metodou a vyjádří se v rozpadech za minutu (dpm). Inkorporace [^{125}I]joddeoxyuridinu se měří prostřednictvím aktivity ^{125}I a rovněž se vyjádří v dpm. V závislosti na použitém přístupu se inkorporace vyjádří v dpm na zkušební skupinu (metoda sdružení) nebo v dpm na pokusné zvíře (individuální přístup).

1.3.3.4 *Pozorování*

1.3.3.4.1 *Klinická pozorování*

Pokusná zvířata je třeba jednou denně pečlivě vyšetřit na jakékoli klinické příznaky, ať již ve formě lokálního podráždění v místě aplikace, nebo ve formě systémové toxicity. Všechna sledování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou zvláště pro každé pokusné zvíře.

1.3.3.4.2 *Tělesná hmotnost*

Jak je uvedeno v odstavci 1.3.3.1, tělesnou hmotnost u jednotlivých pokusných zvířat je třeba zaznamenat na začátku zkoušky a v den plánovaného usmrcení pokusných zvířat.

1.3.4 **Výpočet výsledků**

Výsledky se vyjádří jako index stimulace (SI). Při metodě sdružení exponované skupiny se SI stanoví jako podíl sdružené inkorporované aktivity u jednotlivých experimentálních skupin a sdružené radioaktivity kontrolní skupiny s vehikulem; získá se tak průměrná hodnota SI. Při individuálním přístupu se SI stanoví jako podíl průměrné hodnoty dpm na pokusné zvíře jak u každé exponované skupiny, tak u pozitivní kontrolní skupiny, a průměrné hodnoty dpm na pokusné zvíře u kontrolní skupiny s rozpouštědlem/vehikulem. Průměrná hodnota SI pro kontrolní skupiny s vehikulem je proto 1.

Použití individuálního přístupu při výpočtu SI umožní provést statistickou analýzu dat. Při výběru vhodné metody pro statistickou analýzu si musí být experimentátor vědom možných nestejných odchylek a jiných souvisejících problémů, které si mohou vyžádat transformaci dat nebo neparametrickou statistickou analýzu. Správný přístup k analýze dat spočívá ve vyhodnocení veškerých individuálních dat exponovaných pokusných zvířat a kontrol s vehikulem a proložení regresní křivky závislosti odezvy na dávce při zohlednění intervalů spolehlivosti^{7a)}. V každém případě si však experimentátor musí uvědomovat možné „odlehlé“ reakce u jednotlivých pokusných zvířat v rámci skupiny, které mohou vyžadovat použití jiného hodnocení odezvy (např. použití mediánu namísto průměru) nebo vyřazení těchto odlehklých hodnot.

Do rozhodování, zda jde o pozitivní odezvu, se zahrnuje index stimulace ≥ 3 a zohledňuje se závislost odezvy na dávce a popřípadě statistická významnost^{7a)}.

Je-li nezbytné objasnit získané výsledky, je třeba věnovat pozornost různým vlastnostem zkoušené látky, včetně toho, zda se její struktura podobá struktuře známých senzibilizátorů kůže, zda způsobuje nadměrné podráždění kůže a také povaze zjištěné závislosti odezvy na dávce^{7a)}.

2 DATA

Data se shrnou do tabulky, přičemž pro každou dávkovou skupinu se uvedou průměrné a individuální hodnoty dpm a indexy stimulace (včetně kontrolní skupiny s vehikulem).

3 PROJEKT POKUSU, PROTOKOL POKUSU A ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

V souladu s příslušnými právními předpisy^{9),10)} musí být zpracován projekt pokusu a o průběhu pokusu je nutno vést protokol.

3.1 Zpráva o průběhu pokusu obsahuje tyto informace:

Zkoušená látka:

- identifikační údaje (např. číslo CAS, je-li k dispozici; zdroj, čistota, známé nečistoty; číslo šarže),
- skupenství a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. těkavost, stálost, rozpustnost),
- jedná-li se o směs, složení a poměrné procentuální zastoupení složek.

Vehikulum:

- identifikační údaje (čistota; popřípadě koncentrace; použitý objem),
- zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

- použitý druh myši,
- mikrobiologický stav pokusných zvířat, je-li znám,
- původ, podmínky chovu, krmivo atd.,
- počet, stáří a pohlaví pokusných zvířat.

Zkušební podmínky:

- podrobnosti o přípravě a aplikaci zkoušené látky,
- zdůvodnění výběru dávek, včetně výsledků z orientační studie, pokud byla provedena; použité koncentrace vehikula a zkoušené látky a celkové aplikované množství látky,
- podrobnosti o jakosti vody a krmiva (včetně druhu/zdroje krmiva, zdroje vody).

Kontrola spolehlivosti:

- souhrn výsledků z poslední kontroly spolehlivosti, včetně informací o použité látce, koncentraci a vehikulu,
- data ze souběžných nebo dřívějších pozitivních nebo negativních kontrolních skupin pro danou laboratoř.

Výsledky:

- individuální hmotnosti pokusných zvířat na počátku aplikace a v době plánovaného usmrcení,
- tabulka průměrných (sdružená metoda) a individuálních (individuální přístup) hodnot dpm a rovněž rozpětí hodnot u obou přístupů a indexy stimulace pro jednotlivé dávkové skupiny (včetně kontrolní skupiny s vehikulem),
- případná statistická analýza,
- u každého pokusného zvířete časový průběh nástupu příznaků toxicity, včetně kožního podráždění v místě aplikace, pokud k němu dojde.

Diskuse a interpretace výsledků.

- stručný komentář k výsledkům, k analýze závislosti odezvy na dávce a k případným statistickým analýzám a dále a závěr, zda lze zkušební látku považovat za senzibilizátor kůže.

Závěry.

B.43 ZKOUŠKA NEUROTOXICITY NA HLODAVCÍCH

1 METODA je v souladu s právem Evropských společenství^{7a)}.

Tato zkušební metoda byla navržena za účelem získání informací, které jsou nezbytné ke schválení nebo k další charakterizaci potenciální neurotoxicity chemických látek u dospělých pokusných zvířat. Tuto metodu lze buď kombinovat s již existujícími zkušebními metodami pro studium toxicity po opakovaných dávkách, nebo ji lze provést jako samostatnou zkoušku. Pro usnadnění plánování studií založených na této zkušební metodě se doporučuje prostudovat Doporučení OECD o strategiích a metodách zkoušení neurotoxicity (OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods)^{7a)}. To je zvláště důležité tehdy, je-li třeba zvážit změnu sledování a zkušebních postupů, jak jsou doporučeny pro rutinní používání této metody. Doporučení byla připravena pro usnadnění výběru zkušebních postupů pro specifické podmínky použití. Posouzení vývojové neurotoxicity není předmětem této metody.

1.1 ÚVOD

Při posuzování a vyhodnocování toxických vlastností chemických látek je velmi důležité zvážit potenciál neurotoxických účinků. Již metoda zkoušení systémové toxicity po opakované dávce obsahuje sledování, která mají odkrýt potenciální neurotoxicitu. Předloženou zkušební metodu lze používat při plánování studie za účelem získání dalších informací o neurotoxických účincích zjištěných při studii systémové toxicity po opakovaných dávkách, nebo pro jejich potvrzení. Z úvah o potenciální neurotoxicitě určitých druhů chemických látek však může vyplynout, že by mohla být vhodněji posouzena pomocí této metody, pokud neexistují údaje o potenciální neurotoxicitě ze studií systémové toxicity po opakovaných dávkách. Tyto úvahy zahrnují například

- pozorování neurologických příznaků nebo neuropatologických lézí v jiných studiích toxicity než studiích systémové toxicity po opakovaných dávkách, nebo
- strukturní podobnost nebo jiné informace, které posuzovanou látku váží se známými neurotoxickými látkami.

Kromě toho mohou existovat i další případy, kdy je použití této metody vhodné; další podrobnosti jsou uvedeny v literatuře^{7a)}.

Tato metoda byla navržena tak, aby ji bylo možné přizpůsobit zvláštním potřebám při potvrzování specifické histopatologické a behaviorální neurotoxicity chemických látek a při charakterizaci a kvantifikaci neurotoxických účinků.

Dříve se za neurotoxicitu považovaly neuropatie zahrnující neuropatologické léze nebo neurologické dysfunkce, jako např. záchvaty, ochrnutí nebo třes. I když jsou neuropatie významným projevem neurotoxicity, dnes je již jasné, že existují mnohé další příznaky toxicity pro nervový systém (např. ztráta motorické koordinace, senzorické výpadky, poruchy učení a paměti), které se nemusí projevovat ani neuropatií, ani v jiných typech zkoušek.

Tato metoda zkoušení neurotoxicity je navržena tak, aby odhalovala závažné neurobehaviorální a neuropatologické účinky na dospělé hlodavce. Zatímco behaviorální účinky i při nepřítomnosti morfoloogických změn mohou odrážet nepříznivý vliv na organismus, neznamená to, že všechny behaviorální změny jsou specifické pro nervový systém. Z tohoto důvodu by se měly jakékoliv zjištěné změny vyhodnotit v korelaci s histopatologickými, hematologickými nebo biochemickými výsledky. Zkoušení požadované v této metodě za účelem charakterizace a kvantifikace neurotoxických odpovědí zahrnuje specifické histopatologické a behaviorální postupy, které lze navíc podpořit elektrofyziologickým nebo biochemickým vyšetřením^{7a)}.

Neurotoxické látky mohou působit na množství cílových struktur v rámci nervového systému a prostřednictvím různých mechanismů. Protože neexistuje jediná sada zkoušek pro posouzení neurotoxického potenciálu u všech látek, může být nezbytné využít dalších zkoušek *in vivo* nebo *in vitro*, které jsou specifické pro typ pozorované nebo očekávané neurotoxicity.

Tuto zkušební metodu lze použít také společně s doporučeními OECD o strategiích a metodách testování neurotoxicity (OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods)^{7a)} při plánování zkoušek určených k další charakterizaci nebo zvýšení citlivosti kvantifikace vztahu dávka-odezva s cílem lépe odhadnout úroveň nevyvolávající pozorovatelné nepříznivé účinky, anebo potvrdit známá nebo očekávaná rizika chemických látek. Lze například navrhnout zkoušky, které by identifikovaly a zhodnotily neurotoxický mechanismus (neurotoxické mechanismy) nebo doplnily údaje, které již byly získány základními neurobehaviorálními a neuropatologickými vyšetřovacími postupy. Takové studie nemusí replikovat údaje použitím standardních postupů doporučených v této metodě, jsou-li takové údaje již k dispozici a nepovažují se za nezbytné k interpretaci výsledků z této studie.

Používá-li se tato zkouška neurotoxicity samotná nebo v kombinaci, poskytuje informace, které mohou

- určit, zda zkoušené chemické látky ovlivňují nervový systém trvale, nebo vratně,
- přispět k charakterizaci změn nervového systému spojených s expozicí chemické látky a přispět k pochopení mechanismů účinku,

- stanovit vztahy mezi dávkou a odezvou a časem a odezvou s cílem odhadnout úroveň nevyvolávající pozorovatelné nepříznivé účinky (NOAEL) (kterou lze použít pro vytvoření bezpečnostních kritérií pro chemickou látku).

Tato zkušební metoda používá orální aplikaci zkušební látky. Jiné typy aplikace (např. kožní nebo inhalační) mohou být vhodnější a mohou si také vyžádat modifikaci doporučených postupů. Výběr způsobu aplikace závisí na způsobu expozice člověka a na dostupných toxikologických nebo kinetických informacích.

1.2 DEFINICE

Nepříznivý účinek: je jakákoliv změna spojená s aplikací, která snižuje schopnost organismu přežít, rozmnožovat se nebo se přizpůsobit prostředí.

Neurotoxická: je nepříznivá změna struktury nebo funkce nervového systému, která je výsledkem expozice chemickému, biologickému nebo fyzikálnímu činiteli.

Neurotoxické agens: je jakýkoliv chemický, biologický nebo fyzikální činitel, který má neurotoxický potenciál.

1.3 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená chemická látka se podává orálně v různých dávkách několika skupinám pokusných hlodavců. Obvykle se vyžaduje podávání opakovaných dávek a dávkovací režim může být buď 28 denní, nebo subchronický (90 dnů), nebo chronický (1 rok nebo déle). Postupy stanovené v této zkušební metodě lze použít i při studii akutní neurotoxicity. Pokusná zvířata jsou testována za účelem zjištění nebo charakterizace behaviorálních nebo neurologických odchylek. Během každého pozorovacího období se hodnotí řada znaků chování, které by mohly být ovlivněny neurotoxickými látkami. Na konci zkoušky se u podskupiny pokusných zvířat obou pohlaví z každé skupiny provede perfuze *in situ* a připraví se a vyšetří řezy mozku, míchy a periferních nervů.

Pokud se zkouška provádí jako samostatná zkouška pro vyšetření neurotoxicity nebo charakterizaci neurotoxických účinků, lze pokusná zvířata z každé skupiny, která nebyla použita k perfuzi a k následnému histopatologickému vyšetření (viz tabulka 12), použít ke specifickým neurobehaviorálním, neuropatologickým, neurochemickým nebo elektrofyziologickým vyšetřením, která mohou doplnit údaje získané ze standardních vyšetření vyžadovaných v této metodě^{7a)}. Tyto doplňující postupy mohou být zvláště užitečné tehdy, jestliže empirická pozorování nebo předpokládané účinky naznačují specifický typ nebo cílovou strukturu neurotoxicity chemické látky. Zbývající pokusná zvířata lze případně použít k některým jiným hodnocením, jako jsou např. hodnocení požadovaná ve zkušebních metodách u studií toxicity po opakovaných dávkách na hlodavcích.

Pokud se postupy této zkušební metody kombinují s postupy z jiných zkušebních metod, je nezbytný dostatečný počet pokusných zvířat, aby byly splněny požadavky pro pozorování v obou studiích.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Výběr živočišných druhů

Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan, i když lze po odpovídajícím zdůvodnění použít i jiné druhy hlodavců. Použity by měly být běžně používané laboratorní kmeny mladých zdravých dospělých pokusných zvířat. Samice musí být nullipary a nesmějí být březí. Podávání látky by mělo začít co nejdříve po odstavení, nejlépe když pokusná zvířata dosáhnou stáří šesti týdnů a v každém případě dříve, než dosáhnou stáří devíti týdnů. Pokud se však tato zkouška kombinuje s dalšími zkouškami, je možné, že požadavky týkající se stáří pokusných zvířat budou vyžadovat určité změny. Na začátku studie by měl být u používaných pokusných zvířat jen minimální rozptyl hmotnosti a neměl by překročit 20 % průměrné hmotnosti u jednotlivých pohlaví. Pokud se před dlouhodobou studií provádí orientační krátkodobá studie toxicity po opakovaných dávkách, je třeba u obou studií použít pokusná zvířata ze stejných kmenů a stejného zdroje.

1.4.2 Podmínky chovu a krmení

Teplota ve zkušební místnosti pro pokusná zvířata by měla být $(22 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Relativní vlhkost by měla být alespoň 30 %, neměla by však překročit 70 % během čištění místnosti a cílem je hodnota 50 – 60 %. Osvětlení by mělo být umělé, mělo by se střídát 12 h světla a 12 h tmy, není-li v chovné místnosti denní světlo. Náhlé hlasité zvuky je třeba omezit na minimum. Ke krmení by se mělo používat obvyklé krmivo určené pro pokusná zvířata od registrovaného výrobce s neomezeným přísunem pitné vody. Na výběr krmiva může mít vliv nutnost zajistit vhodnou přísadu pro zkoušenou látku, je-li látka podávána touto metodou. Pokusná zvířata lze chovat jednotlivě, anebo je lze umístit v klecích v malých skupinkách tvořených pokusnými zvířaty stejného pohlaví v souladu s příslušným právním předpisem¹⁰⁾, pokud není stanoveno projektem pokusů jinak.

1.4.3 Příprava pokusných zvířat

Pokusná zvířata jsou vybrána s ohledem na druh, pohlaví a stáří v souladu s ustanovením § 15 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾ a označena tak, aby byla možná identifikace jednotlivých pokusných zvířat. Dobu navykání stanoví § 10 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾. Pokusná zvířata by měla být náhodně rozdělena do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Jednotlivá pokusná zvířata se jednoznačně identifikují a umístí se do klecí nejméně pět dnů před začátkem studie, aby si mohla zvyknout na laboratorní podmínky.

1.4.4 **Způsob aplikace a příprava dávek**

V této zkušební metodě se jedná konkrétně o orální způsob aplikace zkoušené látky. Orální aplikaci lze provádět prostřednictvím žaludeční sondy, krmiva, pitné vody nebo tobolek. Použit lze i jiné způsoby aplikace (např. kožní nebo inhalační), které si mohou vyžádat modifikaci doporučených postupů. Výběr způsobu aplikace závisí na typu expozice člověka a na dostupných toxikologických nebo kinetických informacích. Je třeba uvést důvody pro výběr způsobu aplikace a odpovídající modifikace postupů v rámci této zkušební metody.

Zkoušená látka se podle potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit použití vodného roztoku/suspense, potom použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku/suspense v jiném vehikulu. Je třeba znát toxikologické charakteristiky vehikula. Kromě toho je třeba věnovat pozornost následujícím typickým znakům vehikula: účinku na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené látky a dále účinku na chemické vlastnosti zkoušené látky, které mohou pozměnit její toxické charakteristiky, a účinku na spotřebu krmiva nebo vody anebo nutriční stav pokusných zvířat.

1.5 **POSTUPY**

1.5.1 **Počet a pohlaví pokusných zvířat**

Pokud se studie provádí jako samostatná studie, je třeba použít v každé dávkové a kontrolní skupině alespoň 20 pokusných zvířat (10 samic a 10 samců) pro vyhodnocení podrobných klinických a funkčních pozorování. Alespoň u pěti samců a pěti samic vybraných z těchto deseti samců a samic je třeba na konci zkoušky provést perfuzi *in situ* a použít je k podrobnému neurohistopatologickému vyšetření. V případě, kdy jsou v dané dávkové skupině pozorovány příznaky neurotoxických účinků pouze u omezeného počtu pokusných zvířat, je třeba zvážit přiřazení těchto pokusných zvířat k pokusným zvířatům vybraným pro perfuzi. Pokud se studie provádí v kombinaci se studií toxicity po opakovaných dávkách, je třeba použít odpovídající počet pokusných zvířat, aby bylo možné splnit cíle obou studií. Minimální počet pokusných zvířat na skupinu u nejrůznějších kombinací studií je uveden v tabulce 12. Pokud se plánuje utracení ve vložených intervalech nebo vytvoření reparační skupiny ke sledování vratných účinků, perzistence nebo zpožděného výskytu toxických účinků po skončení aplikace, nebo se zvažují dodatečná sledování, je třeba zvýšit počet pokusných zvířat, aby se zajistil dostatečný počet pokusných zvířat požadovaných ke sledování a k histopatologickému vyšetření.

1.5.2 **Experimentální a kontrolní skupina**

Obecně by měly být použity nejméně tři experimentální a jedna kontrolní skupina; pokud se však podle jiných údajů neočekávají žádné účinky po opakovaných dávkách 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den, může být

provedena limitní zkouška. Nejsou-li k dispozici žádné vhodné údaje, může být provedena předběžná studie pro stanovení rozpětí dávek, které mají být použity. S výjimkou aplikace zkoušené látky je třeba s pokusnými zvířaty v kontrolní skupině zacházet naprosto stejným způsobem, jako s pokusnými zvířaty v experimentální skupině. Pokud se při podávání zkoušené látky používá vehikulum, podává se kontrolní skupině v nejvyšším použitém objemu.

1.5.3 **Kontrola spolehlivosti**

Laboratoř provádějící zkoušku by měla předložit údaje prokazující její způsobilost pro uskutečnění zkoušky a citlivost používaných postupů. Takové údaje by měly poskytnout důkaz o schopnosti odhalit a popřípadě kvantifikovat změny v různých ukazatelích doporučených ke sledování, jako jsou např. vegetativní příznaky, reaktivita na smyslové podněty, síla úchopu a motorická aktivita. Informace o chemických látkách, které způsobují různé typy neurotoxických reakcí a které jsou vhodné jako pozitivní kontrolní látky, lze nalézt v literatuře^{7a)}. Historické údaje lze použít tehdy, pokud zůstanou stejné základní aspekty experimentálních postupů. Doporučuje se pravidelná aktualizace historických údajů. Nové kontrolní údaje by měly být doplněny tehdy, pokud provádějící laboratoř v průběhu zkoušky změní některý základní prvek provádění zkoušky nebo postupu.

1.5.4 **Výběr dávky**

Úroveň dávek je třeba vybrat s ohledem na předchozí zjištěnou toxicitu a kinetické údaje dostupné pro zkoušenou sloučeninu nebo podobné látky. Nejvyšší úroveň dávky se zvolí tak, aby vyvolala neurotoxické nebo jasné systémové toxické účinky, aby bylo možné prokázat závislost odpovědi na dávkách a úroveň dávky bez pozorovatelného nepříznivého účinku (NOAEL), zvolí se sestupná posloupnost úrovní dávek. V zásadě je třeba stanovit úroveň dávek tak, aby bylo možné odlišit primární toxické účinky na nervový systém od systémové toxicity. Obvykle jsou optimální dva až tři intervaly a často je vhodnější přidání čtvrté zkušební skupiny než používání velkých intervalů mezi jednotlivými dávkami (např. lišících se faktorem 10). Rovněž je třeba vzít v úvahu i odhad úrovně expozice u člověka, je-li k dispozici.

1.5.5 **Limitní zkouška**

Pokud zkouška provedená podle postupů popsanych v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den nevyvolá pozorovatelné neurotoxické účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není nezbytné provádět kompletní studii za použití tří úrovní dávek. V některých případech předpokládaná expozice u člověka si vyžádá použití vyšší orální dávky v limitní zkoušce. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň expozice dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušené látky. Při provedení

akutní zkoušky orálně by dávka pro limitní zkoušku měla být alespoň 2 000 mg/kg.

1.5.6 Aplikace dávek

Zkoušená látka se podává pokusným zvířatům denně, 7 dnů v týdnu, po dobu alespoň 28 dnů. Použití 5 denního dávkovacího režimu nebo kratší expozice je třeba zdůvodnit. Je-li látka podávána prostřednictvím žaludeční sondy, měla by se podávat v jedné dávce pomocí sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální množství tekutiny, které lze jednorázově podávat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by neměl překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti. V případě vodných roztoků je však možné zvážit i použití až 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Kromě dráždivých nebo žíravých látek, které při vyšších koncentracích obvykle vyvolají prudké účinky, by se měly změny množství zkoušené látky minimalizovat upravením koncentrace, aby se na všech úrovních dávek zajistilo konstantní množství.

U látek podávaných prostřednictvím krmiva nebo pitné vody je velmi důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky neovlivnilo vyváženost běžného krmiva nebo příjmu vody. Je-li zkoušená látka podávána v krmivu, je třeba používat buď konstantní dietní koncentrace (v ppm), nebo konstantní úroveň dávky, pokud jde o tělesnou hmotnost pokusného zvířete. Použití jiné alternativy je třeba zdůvodnit. U látky podávané prostřednictvím žaludeční sondy je třeba dávku podávat každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně je třeba dávku přizpůsobit tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti pokusného zvířete. Provádí-li se studie opakovaného podávání látky jako předběžná studie pro dlouhodobou studii, mělo by být v obou studiích používáno stejné krmivo. Není-li u akutní studie možnost podávání dávky v celku, je třeba podávat dávku po menších částech po dobu, která by neměla překročit 24 h.

1.6 POZOROVÁNÍ

1.6.1 Četnost pozorování a zkoušek

U studií s opakovanou dávkou by doba pozorování měla pokrýt celé dávkovací období. U studií akutní toxicity pozorování pokračuje ještě 14 dnů po skončení aplikace. U pokusných zvířat v satelitních skupinách, která jsou v období po skončení aplikace chována bez expozice, by pozorování mělo pokrýt i toto období.

Pozorování je třeba provádět dostatečně často, aby bylo možné odhalit jakékoli behaviorální nebo neurologické abnormality s co největší pravděpodobností. Pozorování se provádí denně, pokud možno ve stejnou dobu a s přihlédnutím k době očekávaného maxima účinku po podání látky. Četnost klinických pozorování a funkčních zkoušek je shrnuta v tabulce 13. Pokud kinetické nebo jiné údaje získané z předchozích studií naznačují potřebu zvolit časové body pozorování nebo zkoušek nebo období po skončení pozorování, je nutné zvolit takový náhradní plán, na

jehož základě lze získat maximální množství informací. Změny plánu je třeba zdůvodnit.

1.6.1.1 *Pozorování celkového zdravotního stavu a mortality/morbidity*

U všech pokusných zvířat se alespoň jednou denně pečlivě kontroluje jejich zdravotní stav a nejméně dvakrát denně se provede prohlídka všech pokusných zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality.

1.6.1.2 *Podrobná klinická pozorování*

Podrobná klinická pozorování se provedou u všech pokusných zvířat vybraných k těmto účelům (viz tabulka 12) nejprve před první expozicí (aby bylo možné intraindividuální srovnání) a poté v různých intervalech podle trvání studie (viz tabulka 13). Podrobná klinická pozorování u satelitních zotavovacích skupin se provedou na konci zotavovacího období. Podrobná klinická pozorování se provádějí mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru. Pozorování se pečlivě zaznamenají pomocí systémů hodnocení, které zahrnují kritéria nebo bodovací stupnice pro jednotlivá měření v rámci pozorování. Používaná kritéria nebo stupnice musí být explicitně definována zkušební laboratoří. Je třeba dbát na to, aby byly rozdíly ve zkušebních podmínkách co nejmenší (a nesouvisely systematicky s aplikací) a aby vyšetření prováděly osoby, které nejsou informovány o skupině, do které pokusné zvíře patří.

Doporučuje se provádět pozorování strukturovaně, přičemž se u každého pokusného zvířete při každém pozorování systematicky používají jasně definovaná kritéria (včetně definice normálního „rozpětí“). „Normální rozpětí“ je třeba dostatečně zdokumentovat. Všechny pozorované příznaky se zaznamenají. Je-li to možné, zaznamená se rovněž závažnost pozorovaných příznaků. Klinická pozorování zahrnují kromě změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a autonomních funkcí (slzení, zjevení srsti, velikost zornic, nezvyklý průběh dýchání nebo dýchání ústy, nezvyklé příznaky močení nebo defekace a zbarvení moči).

Zaznamenají se rovněž nezvyklé projevy, pokud jde o polohu těla, úroveň aktivity (např. snížené nebo zvýšené zkoumání standardního pozorovacího prostoru) a koordinaci pohybu. Zaznamenají se také změny chůze (např. kolébání, ataxie), polohy (nahrbení hřbetu) a reakce na manipulaci, umístění a další stimuly související s prostředím, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, křečí nebo třesu, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění, nezvyklých pohybů hlavy nebo opakovaného kroužení) nebo zvláštního chování (např. kousání nebo nadměrného olizování, sebepoškozování, pohybu pozpátku, vydávání zvuků) anebo agresivity.

1.6.1.3 *Funkční zkoušky*

Podobně jako podrobná klinická pozorování se u jednotlivých pokusných zvířat vybraných k těmto účelům provedou i funkční zkoušky – nejprve před expozicí a potom vícekrát po jejím provedení (viz tabulka 12).

Četnost funkčního testování závisí rovněž na trvání studie (viz tabulka 13). Mimo dobu pozorování stanovenou v tabulce 13 se provede také funkční pozorování satelitní zotavovací skupiny, a to těsně před plánovaným utracením. Funkční zkoušky zahrnují reakce na různé smyslové podněty [např. sluchové, zrakové a dotykové (případně taktilní) podněty^{7a)}], hodnocení síly stisku^{7a)} a hodnocení motorické aktivity^{7a)}. Motorická aktivita se měří pomocí automatického přístroje schopného odhalit jak snížení, tak i zvýšení této aktivity. Pokud se použije jiný systém, měl by být kvantitativní a je třeba prokázat jeho citlivost a spolehlivost. Každý přístroj je nutné otestovat, aby se zajistila jeho spolehlivost po celé časové období a homogenita s ostatními přístroji. Další podrobnosti o postupech, kterými se lze řídit, jsou uvedeny v příslušných odkazech. Pokud neexistují žádné údaje (např. údaje o vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou, epidemiologické údaje, jiné toxikologické studie), které by ukazovaly na potenciální neurotoxické účinky, je nutné za účelem podrobnějšího vyšetření těchto možných účinků zvážit začlenění specializovanějších zkoušek smyslových a motorických funkcí nebo učení a paměti. Další informace o specializovanějších zkouškách a jejich používání je uvedeno v literatuře^{7a)}.

Ve výjimečných případech lze pokusná zvířata vykazující známky toxicity v takové míře, která by významně narušila provedení funkční zkoušky, z této zkoušky vyřadit. Vyřazení těchto pokusných zvířat z funkčních zkoušek je nutné zdůvodnit.

1.6.2 Tělesná hmotnost a spotřeba krmiva a vody

U studií s délkou trvání do 90 dnů se všechna pokusná zvířata váží alespoň jednou týdně a každý týden se rovněž provádí měření spotřeby krmiva (měření spotřeby vody se provádí tehdy, je-li zkoušená látka aplikována prostřednictvím tohoto média). U dlouhodobých studií se všechna pokusná zvířata váží alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou za 4 týdny. Během prvních 13 týdnů se měří spotřeba krmiva (měření spotřeby vody se provádí tehdy, je-li zkoušená látka aplikována prostřednictvím tohoto média) a poté přibližně v tříměsíčních intervalech, pokud si změny zdravotního stavu nebo změny tělesné hmotnosti nevyžadají jiný interval.

1.6.3 Oftalmologické vyšetření

U studií delších než 28 dnů se před aplikací zkoušené látky a před ukončením studie provede oftalmologické vyšetření pomocí oftalmoskopu nebo jiného vhodného nástroje, a to nejlépe u všech pokusných zvířat, alespoň však u všech pokusných zvířat ze skupin s vysokou dávkou a z kontrolních skupin. Pokud se zjistí změny na očích nebo pokud klinické příznaky ukazují na nutnost vyšetření očí, vyšetří se všechna pokusná zvířata. U dlouhodobých studií se oftalmologické vyšetření provede ve 13. týdnu stáří pokusných zvířat. Oftalmologická vyšetření není nutné provádět tehdy, jsou-li již k dispozici údaje z jiných podobně dlouhých studií s podobnými úrovněmi dávek.

1.6.4 **Hematologické a biochemické vyšetření**

Pokud se studie neurotoxicity provádí v kombinaci se studií systémové toxicity po opakované dávce, provede se hematologické vyšetření a stanovení klinických biochemických parametrů tak, jak je uvedeno v příslušné metodě studie systémové toxicity. Odebírání vzorků se provede tak, aby se minimalizovaly jakékoliv účinky na nervový systém a chování.

1.6.5 **Histopatologie**

Neuropatologické vyšetření se navrhne tak, aby doplnilo a rozšířilo pozorování provedená v rámci této studie během fáze *in vivo*. Tkáně alespoň 5 pokusných zvířat každého pohlaví z každé skupiny (viz tabulka 12 a další odstavec) se fixují *in situ* za použití obecně uznávaných perfuzních a fixačních technik^{7a)}. Zaznamenají se jakékoliv výrazné změny. Pokud se studie provádí jako samostatná studie neurotoxicity nebo studie charakterizující neurotoxické účinky, lze použít zbytek pokusných zvířat buď ke specifickým neurobehaviorálním^{7a)}, neuropatologickým^{7a)}, neurochemickým^{7a)}, nebo elektrofyziologickým^{7a)} postupům, které mohou doplnit zde popsané postupy a vyšetření, anebo zvýšit počet subjektů vyšetřovaných k histopatologickým účelům. Tyto doplňkové postupy jsou zvláště užitečné tehdy, pokud empirická pozorování nebo očekávané účinky ukazují na specifický typ nebo cílovou strukturu neurotoxicity^{7a)}. Je také možné zbytek pokusných zvířat použít k běžným patologickým hodnocením, která jsou popsána v metodě studie po opakované dávce.

U všech tkáňových vzorků zalitých parafínem se provede běžný postup barvení, např. pomocí hematoxylinu a eosinu (H&E), a mikroskopické vyšetření. Jsou-li pozorovány nebo existuje-li podezření na příznaky periferní neuropatie, vyšetří se vzorky periferních nervů zalitých do pryskyřic (vosků). Klinické příznaky mohou rovněž poukázat na další místa, která je nutné vyšetřit, nebo na nutnost použít speciální postupy barvení. Pokyny k určení dalších míst, která je třeba vyšetřit, lze nalézt v literatuře^{7a)}. K prokázání charakteristických typů patologické změny může přispět i odpovídající speciální barvení^{7a)}.

U reprezentativních řezů centrálního a periferního nervového systému se provede histologické vyšetření^{7a)}. Mezi vyšetřované oblasti obvykle patří: přední mozek, střední část mozku, včetně řezu hippocampem, střední mozek, mozeček, Varolův most, prodloužená mícha, oko se zrakovým nervem a sítnicí, mícha v oblasti cervikálního a lumbálního zesílení, dorsální kořenová ganglia, dorsální a ventrální kořenová vlákna, proximální část *n. ischiadicus* a proximální část *n. tibialis* (v oblasti kolena) a *n. tibialis* z oblasti lýtkového svalu. Řezy míchy a periferních nervů by měly zahrnovat jak příčné, tak i podélné řezy. Pozornost je nutné věnovat uspořádání cév v oblasti nervového systému. Rovněž se vyšetří vzorky z kosterního svalstva, a to zvláště z lýtkového svalu. Zvláštní pozornost je nutné věnovat místům s buněčnou a vláknitou strukturou a těm strukturám v oblasti CNS a PNS, o nichž je známo, že na ně mají neurotoxické látky velký vliv.

Informace o neuropatologických změnách, které obvyklé vyplývají z expozice toxickým látkám, lze nalézt v literatuře^{7a)}. Doporučuje se postupné vyšetření tkáňových vzorků, při kterém se porovnají nejprve vzorky řezů ze skupiny s vysokou dávkou se vzorky řezů z kontrolní skupiny. Nejsou-li ve vzorcích z těchto skupin zjištěny žádné neuropatologické změny, není třeba provádět další analýzu. Jsou-li zjištěny ve skupině s vysokou dávkou neuropatologické změny, je třeba následně okódotovat a vyšetřit vzorky ze všech potenciálně zasažených tkání ze skupin se střední a nízkou dávkou.

Pokud je během kvalitativního vyšetření zjištěna přítomnost neuropatologických změn, provede se druhé vyšetření všech oblastí nervového systému, které vykazují tyto změny. Okódují se řezy ze všech dávkových skupin ze všech potenciálně zasažených oblastí a vyšetří v náhodném pořadí bez znalostí kódu. Zaznamená se četnost a závažnost všech lézí. Po zhodnocení všech oblastí ze všech dávkových skupin se kód odkryje a provede se statistická analýza za účelem vyhodnocení vztahu dávka-odezva. U každé léze se popíší příklady různých stupňů závažnosti.

Neuropatologické výsledky se vyhodnotí v kontextu s pozorováním a měřením chování a rovněž spolu s dalšími údaji z předchozích a souběžných studií systémové toxicity zkoušené látky.

2 DATA

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Uvedou se jednotlivá data. Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou experimentální nebo kontrolní skupinu uvede počet pokusných zvířat na začátku zkoušky, počet pokusných zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo počet pokusných zvířat utracených z humánních důvodů a doba uhynutí nebo humánního utracení, počet pokusných zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis zjištěných příznaků toxicity, včetně doby nástupu, trvání, typu a závažnosti jakýchkoliv příznaků toxicity, počet pokusných zvířat vykazujících léze, včetně typu a závažnosti léze (lézí).

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky studie je třeba vyhodnotit z hlediska výskytu, závažnosti a korelace neurobehaviorálních a neuropatologických účinků (rovněž i neurochemických nebo elektrofyzilogických účinků, jsou-li provedena doplňující vyšetření) a z hlediska dalších zjištěných nepříznivých účinků. Je-li to možné, je třeba vyhodnotit číselné výsledky vhodnými a obecně uznávanými statistickými metodami. Statistické metody je třeba zvolit během plánování studie.

3 **PROJEKT POKUSU, PROTOKOL POKUSU A ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA**

V souladu s příslušnými právními předpisy^{9),10)} musí být zpracován projekt pokusu a o průběhu pokusu je nutno vést protokol.

3.1 Zpráva o průběhu pokusu obsahuje tyto informace:

Zkoušená látka:

- fyzikální vlastnosti (včetně isomerie, čistoty a fyzikálně-chemických vlastností),
- údaje o identitě.

Vehikulum (pokud bylo použito):

- zdůvodnění volby vehikula.

Pokusná zvířata:

- použité druhy a kmen,
- počet, stáří a pohlaví pokusných zvířat,
- původ, podmínky chovu, aklimatizace, krmivo atd.,
- hmotnost jednotlivých pokusných zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

- podrobnosti o úpravě směsi zkoušené látky či přípravě krmiva, dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,
- specifikace aplikovaných dávek, včetně podrobností o vehikulu, objemu a fyzikální formě aplikovaného materiálu,
- podrobnosti o způsobu aplikace zkoušené látky,
- zdůvodnění výběru úrovní dávek,
- zdůvodnění způsobu aplikace a trvání expozice,
- přepočítání koncentrace zkoušené látky v krmivu nebo pitné vodě (ppm) na skutečnou denní dávku v mg/kg tělesné hmotnosti,
- podrobnosti o krmivu a kvalitě vody.

Pozorovací a zkušební postupy:

- podrobnosti o přiřazení pokusných zvířat z jednotlivých skupin do podskupin s perfuzí,

- podrobnosti o systémech posuzování, včetně kritérií a posuzovacích stupnic pro jednotlivá měření v rámci podrobných klinických pozorování,
- podrobnosti o funkčních testech pro měření reakce různých smyslových orgánů na smyslové podněty (např. sluchové, zrakové a dotykové), pro hodnocení síly úchopu, motorické aktivity (včetně podrobností o automatických zařízeních pro zjišťování aktivity) a další použité postupy,
- podrobnosti oftalmologických vyšetření, hematologických a biochemických vyšetření s příslušnými výchozími (normálními) hodnotami,
- podrobnosti o specifických neurobehaviorálních, neuropatologických, neurochemických nebo elektrofyziologických postupech.

Výsledky:

- tělesná hmotnost a její změny, včetně tělesné hmotnosti v době utracení,
- spotřeba krmiva a případně vody,
- údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávek, včetně popisu příznaků toxicity nebo mortality,
- povaha, závažnost a trvání (doba nástupu a následný průběh) podrobných klinických nálezů (zda jsou vratné nebo nevratné),
- podrobný popis všech výsledků funkčních testů,
- pitevni nálezy,
- podrobný popis všech neurobehaviorálních, neuropatologických a neurochemických nebo elektrofyziologických výsledků, jsou-li k dispozici,
- údaje o absorpci a metabolismu, jsou-li k dispozici,
- statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné.

Diskuse a interpretace výsledků.

- informace o závislosti účinku na dávce,
- význam jakýchkoliv dalších toxických účinků pro závěry týkající se neurotoxického potenciálu zkoušené chemické látky,
- dávková úroveň bez pozorovatelných nepříznivých účinků (NOAEL),

— je žádoucí uvést konkrétní vyjádření o celkové neurotoxicitě zkoušené chemické látky.

Závěry.

Tabulka 12:

Minimální počet pokusných zvířat na skupinu, provádí-li se studie neurotoxicity samostatně nebo v kombinaci s dalšími studiiemi

	TYP PROVEDENÉ STUDIE NEUROTOXICITY:			
	Samostatná studie	Kombinovaná studie s 28 denní studii	Kombinovaná studie s 90 denní studii	Kombinovaná studie se studií chronické toxicity
Počet pokusných zvířat na skupinu	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic	15 samců a 15 samic	25 samců a 25 samic
Počet pokusných zvířat vybraných k funkčnímu testování, včetně podrobných klinických pozorování	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic
Počet pokusných zvířat vybraných k perfuzi <i>in situ</i> a neurohistopatologickému vyšetření	5 samců a 5 samic	5 samců a 5 samic	5 samců a 5 samic	5 samců a 5 samic
Počet pokusných zvířat vybraných k pozorování toxicity po opakované dávce subchronické/chronické, k hematologickému vyšetření, klinickému biochemickému vyšetření, k histopatologickému vyšetření atd., jak je uvedeno v příslušných <i>Doporučeních</i>		5 samců a 5 samic	10 samců [†] a 10 samic [†]	20 samců [†] a 20 samic [†]
Případná doplňující pozorování	5 samců a 5 samic			

[†] Zahrnuto je pět pokusných zvířat vybraných k funkčnímu testování a podrobnému klinickému pozorování jako součást studie neurotoxicity.

Tabulka 13:

Četnost klinických pozorování a funkčních testů

Typ pozorování		Délka studie			
		akutní	28 denní	90 denní	chronická
U všech pokusných zvířat	Celkový zdravotní stav	Denně	Denně	Denně	Denně
	Mortalita/morbidita	Dvakrát denně	Dvakrát denně	Dvakrát denně	Dvakrát denně
U všech pokusných zvířat vybraných k funkčním pozorováním	Podrobná klinická pozorování	– před první expozicí – v průběhu 8 h po podání dávky v době odhadovaného nejvyššího účinku – 7. a 14. den po skončení dávkování	– před první expozicí – poté jednou týdně	– první expozice – jednou prvního nebo druhého expozice – poté měsíčně	– před první expozicí – jednou na konci měsíce expozice – poté každé tři měsíce
	Funkční testy	– před první expozicí – v průběhu 8 h po podání dávky v době odhadovaného nejvyššího účinku – 7. a 14. den po skončení dávkování	– před expozicí – během čtvrtého týdne aplikace co nejbližší ke konci období expozice	– před expozicí – jednou prvního nebo druhého expozice – poté měsíčně	– před první expozicí – jednou na konci měsíce expozice – poté každé tři měsíce

Čl. II

Tato vyhláška nabývá účinnosti dnem 15. listopadu 2005.

Ministr:

MUDr. **Rath** v. r.



ISSN 1211-1244

Vydává a tiskne: Tiskárna Ministerstva vnitra, p. o., Bartůňkova 4, pošt. schr. 10, 149 01 Praha 415, telefon: 272 927 011, fax: 974 887 395 – **Redakce:** Ministerstvo vnitra, Nám. Hrdinů 1634/3, pošt. schr. 155/SB, 140 21 Praha 4, telefon: 974 817 287, fax: 974 816 871 – **Administrace:** písemně objednávky předplatného, změny adres a počtu odebíraných výtisků – MORAVIAPRESS, a. s., U Póny 3061, 690 02 Břeclav, fax: 519 321 417, e-mail: sbirky@moraviapress.cz. Objednávky ve Slovenské republice přijímá a titul distribuuje Magnet-Press Slovakia, s. r. o., Teslova 12, 821 02 Bratislava, tel.: 00421 2 44 45 46 28, fax: 00421 2 44 45 46 27. **Roční předplatné** se stanovuje za dodávku kompletního ročníku včetně rejstříku a je od předplatitelů vybíráno formou záloh ve výši oznámené ve Sbírce zákonů. Závěrečné vyúčtování se provádí po dodání kompletního ročníku na základě počtu skutečně vydaných částek (první záloha na rok 2006 činí 3000,- Kč) – Vychází podle potřeby – **Distribuce:** MORAVIAPRESS, a. s., U Póny 3061, 690 02 Břeclav, celoroční předplatné – 516 205 176, 519 305 176, 516 205 174, 519 205 174, objednávky jednotlivých částek (dobírky) – 516 205 207, 519 305 207, objednávky-knihkupci – 516 205 161, 519 305 161, faxové objednávky – 519 321 417, e-mail – sbirky@moraviapress.cz, zelená linka – 800 100 314. **Internetová prodejna:** www.sbirkyzakonu.cz – **Drobný prodej** – **Benešov:** Oldřich HAAGER, Masarykovo nám. 231; **Brno:** Ing. Jiří Hrazdil, Vranovská 16, SEVT, a. s., Česká 14; **Břeclav:** Prodejna tiskovin, 17. listopadu 410, tel.: 519 322 132, fax: 519 370 036; **České Budějovice:** SEVT, a. s., Česká 3, tel.: 387 432 244; **Hradec Králové:** TECHNOR, Wonkova 432; **Cheb:** EFREX, s. r. o., Karlova 31; **Chomutov:** DDD Knihkupectví – Antikvariát, Ruská 85; **Kadaň:** Kniharství – Příbíkova, J. Švermy 14; **Kladno:** eL VaN, Ke Stadionu 1953; **Klatovy:** Krameriovo knihkupectví, nám. Míru 169; **Liberec:** Podještědské knihkupectví, Moskevská 28; **Litoměřice:** Jaroslav Tvrdlík, Lidická 69, tel.: 416 732 135, fax: 416 734 875; **Most:** Knihkupectví „U Knihomila“, Ing. Romana Kopková, Moskevská 1999; **Olomouc:** ANAG, spol. s r. o., Denisova č. 2, Zdeněk Chumchal – Knihkupectví Tycho, Ostružnická 3, Knihkupectví SEVT, a. s., Ostružnická 10; **Ostrava:** LIBREX, Nádražní 14, Profesio, Hollarova 14, SEVT, a. s., Nádražní 29; **Otrokovice:** Ing. Kučeřík, Jungmannova 1165; **Pardubice:** LEJHANEK, s. r. o., třída Míru 65; **Plzeň:** TYPOS, a. s. Úslavská 2, EDICUM, Vojanova 45, Technické normy, Lábkova pav. č. 5, Vydavatelství a naklad. Aleš Čeněk, nám. Českých bratří 8; **Praha 1:** Dům učebnic a knih Černá Labuť, Na Poříčí 25, FIŠER-KLEMENTINUM, Karlova 1, LINDE Praha, a. s., Opletalova 35, NEO-LUXOR s. r. o., Václavské nám. 41; **Praha 2:** ANAG, spol. s r. o., nám. Míru 9 (Národní dům), SEVT a. s., Slezská 126/6; **Praha 4:** SEVT, a. s., Jihlavská 405; **Praha 5:** SEVT, a. s., E. Peškové 14; **Praha 6:** PPP – Staňková Isabela, Puškinovo nám. 17; **Praha 7:** MONITOR CZ, s. r. o., V háji 6, tel.: 272 735 797; **Praha 8:** JASIPA, Zenklova 60, Specializovaná prodejna Sbírky zákonů, Sokolovská 35, tel.: 224 813 548; **Praha 9:** Abonentní tiskový servis-Ing. Urban, Jablonecká 362, po-pá 7-12 hod., tel.: 286 888 382, e-mail: tiskovy.servis@abonent.cz; **Praha 10:** BMSS START, s. r. o., Vínohradská 190; **Přerov:** Odborné knihkupectví, Bartoňova 9, Jana Honková – YAHO – i – centrum, Komenského 38; **Sokolov:** KAMA, Kalousek Milan, K. H. Borovského 22, tel.: 352 303 402; **Šumperk:** Knihkupectví D & G, Hlavní tř. 23; **Tábor:** Milada Šimonová – EMU, Budějovická 928; **Teplice:** Knihkupectví L & N, Masarykova 15; **Trutnov:** Galerie ALFA, Bulharská 58; **Ústí nad Labem:** Severočeská distribuční, s. r. o., Havířská 327, tel.: 475 259 032, fax: 475 259 029, Kartoon, s. r. o., Solvayova 1597/3, Vazby a doplňování Sbírek zákonů včetně dopravy zdarma, tel.+fax: 475 501 773, www.kartoon.cz, e-mail: kartoon@kartoon.cz; **Zábřeh:** Mgr. Ivana Patková, Žižkova 45; **Zátec:** Prodejna U Pivovaru, Žižkovo nám. 76, Jindřich Procházka, Bezděkov 89 – Vazby Sbírek, tel.: 415 712 904. **Distribuční podmínky předplatného:** jednotlivé částky jsou expedovány neprodleně po dodání z tiskárny. Objednávky nového předplatného jsou vyřizovány do 15 dnů a pravidelné dodávky jsou zahajovány od nejbližší částky po ověření úhrady předplatného nebo jeho zálohy. Částky vyšlé v době od zaividování předplatného do jeho úhrady jsou doposílány jednorázově. Změny adres a počtu odebíraných výtisků jsou prováděny do 15 dnů. **Reklamacce:** informace na tel. číslech 516 205 207, 519 305 207. V písemném styku vždy uvádějte IČO (právnícká osoba), rodné číslo (fyzická osoba). **Podávání novinových zásilek** povoleno Českou poštou, s. p., Odstěpný závod Jižní Morava Ředitelství v Brně č. j. P/2-4463/95 ze dne 8. 11. 1995.